

VILNIAUS UNIVERSITETAS

DAIVA KANOPIENĖ

MIKROSATELITŲ NESTABILUMO IR DNR PAŽAIDŲ TAISYMO
SISTEMOS BALTYMŲ RAIŠKOS TYRIMŲ KLINIKINĖ SVARBA
SERGANT GIMDOS KŪNO VĖŽIU

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06B)

Vilnius, 2014

Moksliniai tyrimai atlikti ir disertacija rengta 2010–2014 metais Nacionaliniame vėžio institute (buvusiame Vilniaus universiteto Onkologijos institute).

Disertacija ginama eksternu.

Moksliniai konsultantai:

prof. habil. dr. Konstantinas Povilas Valuckas (Nacionalinis vėžio institutas; biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

dr. Jolanta Vidugirienė (*Promega Corporation*, Madisonas, JAV; fiziniai mokslai, biochemija – 04P)

Kalbos redaktorė

Gražina Pruskuvienė

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju Nacionalinio vėžio instituto (anksčiau Vilniaus universiteto Onkologijos institutas) administracijai ir direktoriui prof. dr. Narimantui Evaldui Samalavičiui už suteiktą galimybę ir paramą vykdant šį mokslinį darbą.

Esu ypač dėkinga mokslinio darbo konsultantams – prof. habil. dr. Konstantinui Povilui Valuckui ir dr. Jolantai Vidugirienei. Prof. K. P. Valuckui dėkoju už diskusijas bei konsultacijas klinikiniais darbo aspektais, nuostatas siekti kuo geresnių darbo rezultatų ir nuolatinį skatinimą tobulėti. Dr. J. Vidugirienei ir kolegai iš JAV dr. Jeff Bacher labai dėkinga už galimybę realizuoti mokslinę idėją bei pagalbą organizuojant tyrimus *Promega* korporacijoje.

Labai ačiū Instituto kolegoms prof. dr. Janinai Didžiapetrienei, dr. Saulei Uleckienei, prof. dr. Kęstučiui Sužiedėliui, dr. Giedrei Smailytei už nuoširdų bendradarbiavimą ir patarimus vykdant mokslinį tyrimą bei skelbiant rezultatus.

Nuoširdžiai dėkoju genetikai Genovefai Chvatovič ir jaunesniajai mokslo darbuotojai Dianai Schveigert už metodinę ir praktinę pagalbą ruošiant medžiagą molekuliniais tyrimams.

Labai dėkinga Valstybinio patologijos centro darbuotojams – prof. dr. Arvydui Laurinavičiui, doc. dr. Aidai Laurinavičienei ir gydytojui patologui konsultantui Raimundui Meškauskui už histologinių ir imunohistocheminių tyrimų vertinimą bei konsultacijas.

Taip pat esu dėkinga savo šeimai už visapusišką palaikymą ir supratimą.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
1. ĮVADAS.....	8
1.1. Darbo tikslas.....	9
1.2. Darbo uždaviniai	10
1.3. Ginamieji teiginiai.....	10
1.4. Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė.....	11
1.5. Autoriaus indėlis	11
2. LITERATŪROS APŽVALGA	12
2.1. Mikrosatelitai ir jų nestabilumas	12
2.2. Mikrosatelitų nestabilumas sergant įvairių lokalizacijų vėžiu.....	22
2.3. Mikrosatelitų nestabilumas ir Lynčo sindromas	27
2.4. Gimdos kūno vėžio paplitimas ir rizikos veiksniai.....	36
2.5. Gimdos kūno vėžio kancerogenezė.....	39
2.6. Mikrosatelitų nestabilumas ir gimdos kūno vėžio molekulinį ypatumų praktiniai aspektai	42
3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI	46
3.1. Tiriamieji ir jų charakteristikos.....	46
3.2. Tyrimo metodai	48
3.2.1. Anketinė apklausa	48
3.2.2. Antropometriniai matavimai	48
3.2.3. DNR gryninimas iš navikinio audinio.....	49
3.2.4. DNR gryninimas iš kraujo.....	49
3.2.5. Išgrynintos DNR kokybės nustatymas	50
3.2.6. Mikrosatelitų nestabilumo nustatymas	50
3.2.7. Mikrosatelitų nestabilumo vertinimas	55

3.2.8. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos nustatymas	55
3.2.9. Statistinė duomenų analizė.....	56
4. REZULTATAI.....	57
4.1. Mikrosatelitų nestabilumas sergant gimdos kūno vėžiu.....	57
4.1.1. Mikrosatelitų nestabilumo analizė naudojant žymenis BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27	57
4.1.2. Mikrosatelitų nestabilumo analizė naudojant žymenis BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59.....	69
4.2. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2, MSH6, PMS2) raiška gimdos kūno navikuose ...	75
4.2.1. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2, MSH6, PMS2) raiškos analizė navikuose, kuriuose mikrosatelitų nestabilumas nustatytas naudojant žymenis BAT-25, BAT-26, Nr-21, NR-24 ir MONO-27.....	75
4.2.2. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2, MSH6, PMS2) raiškos analizė navikuose, kuriuose mikrosatelitų nestabilumas nustatytas naudojant žymenis BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59.....	83
4.2.3. Pacienčių atranka gydytojo genetiko konsultacijai ir molekuliniais genetiniams tyrimams	89
4.3. Mikrosatelitų nestabilumo įtaka pacienčių išgyvenamumui	91
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	101
6. IŠVADOS	111
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	112
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	113
9. PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI.....	130
PRIEDAI.....	132

SANTRUMPOS

A	– adeninas
Ak	– antikūnas
C	– citozinas
CpG	– citozino-guanino dinukleotidai
DNR	– dezoksiribonukleorūgštis
FIGO	– Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija (angl. <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>)
G	– guaninas
G1	– gerai diferencijuotas navikas
G2	– vidutiniškai diferencijuotas navikas
G3	– blogai diferencijuotas navikas
HNPCC	– paveldimas nepolipozinis storosios žarnos vėžys (angl. <i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>)
IHC	– imunohistocheminis tyrimas
KMI	– kūno masės indeksas
kn (kb)	– kilonukleotidai (kilobazės)
Mn (Mb)	– meganukleotidai (megabazės)
MMR	– klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo (angl. <i>Mismatch Repair</i>) sistema
MSI	– mikrosatelitų nestabilumas (angl. <i>Microsatellite Instability</i>)
MSI-H	– mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas (angl. <i>High Frequency Microsatellite Instability</i>)
MSI-L	– mikrosatelitų mažo dažnio nestabilumas (angl. <i>Low Frequency Microsatellite Instability</i>)
MSS	– mikrosatelitų stabilumas (angl. <i>Microsatellite Stability</i>)
Np	– nukleotidų poros
<i>p</i>	– reikšmingumo lygmuo
PGR	– polimerazės grandininė reakcija

- PI – pasikliautinis intervalas
- RNR – ribonukleorūgštis
- T – timinas
- TNM – Piktybinių navikų išplitimo vertinimo sistema (angl. *Tumor, Nodes, Metastasis*)
- ŽPV – žmogaus papilomos virusas

1. ĮVADAS

Pasaulyje gimdos kūno vėžys užima septintąją vietą tarp visų piktybinių navikų ir yra labiausiai paplitęs moterų lyties organų navikas [1]. Gimdos kūno vėžys ypač dažnas ekonomiškai stipriose Europos ir Šiaurės Amerikos šalyse: jose sergamumas apie 10 kartų didesnis, palyginti su sergamumu ekonomiškai silpnose šalyse [2]. Centrinėje ir Rytų Europoje sergamumo ir mirtingumo rodikliai yra atitinkamai 15,6/100 000 ir 3,4/100 000 moterų [3]. Remiantis *EUROCARE* (angl. *European Cancer Registry based study on survival and care of cancer patients*) duomenimis, penkerių metų išgyvenamumas Europoje siekia 75 proc. [4].

Gimdos kūno vėžys yra vienas dažniausių tarp moterų lyties organų piktybinių navikų ir Lietuvoje: sergamumo ir mirtingumo rodikliai atitinkamai – 18,8/100 000 ir 3,4/100 000 moterų [5].

Šiuolaikinės molekulinės biologijos pasiekimai įgalino sukurti modernius genomo tyrimo metodus, kuriuos panaudojus galima skirtingais aspektais aiškintis kancerogenezės mechanizmus, prognozuoti ligos eigą bei parinkti individualų gydymą [6].

Plačiai tyrinėjamas mikrosatelitų nestabilumas sergant įvairių lokalizacijų navikais. Mikrosatelitai – tai trumpos iki 150 nukleotidų porų ilgio kartotinės DNR sekos, kurių atskirą pasikartojantį elementą (t. y. paeiliui pasikartojančią seką) dažniausiai sudaro 1–5 nukleotidai [7].

Svarbiausias veiksnys, kuris lemia mikrosatelitų nestabilumą, yra klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo (MMR; angl. *Mismatch Repair*) sistemos sutrikimas [8]. Veikli tokia sistema pakeičia klaidingai į grandinę įjungtus nukleotidus, užtikrina tik identiškų grandinių rekombinaciją ir yra ląstelės DNR pažaidų taisymo sistemos dalis. Mikrosatelitų nestabilumo fenomenas ir klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos genų mutacijos pirmą kartą charakterizuoti 1993 metais tiriant paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio (Lynčo sindromo) atvejus [9, 10]. Mikrosatelitų nestabilumas taip pat nustatomas ir kitų lokalizacijų navikuose,

susijusiuose su Lynčo sindromu [11]. Reikia pažymėti, kad mikrosatelitų nestabilumas nustatomas ir sporadiniuose navikuose, ypač storosios žarnos ir gimdos kūno.

Duomenų apie mikrosatelitų nestabilumą ir klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raišką, esant storosios žarnos navikams (tiek susijusiems su Lynčo sindromu, tiek sporadiniams), sukaupta nemažai ir įvertinta jų prognozinė bei predikcinė reikšmė, o tokie duomenys gimdos kūno vėžio atvejais dar tik kaupiami ir nėra susisteminti. Reikia pažymėti, kad tyrinėjant sąsają tarp mikrosatelitų nestabilumo ir naviko bei organizmo klinikinių-patologinių charakteristikų gauti nevienareikšmiai rezultatai [12, 13].

Mikrosatelitų nestabilumui vertinti naudojami įvairūs žymenys. JAV nacionalinis vėžio institutas rekomenduoja tirti penkias genomo sritis ir naudoti penkių žymenų rinkinį: BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346 ir D17S250 [14]. Įvairūs gamintojai pateikia rinkai ir kitokių žymenų rinkinius. Todėl, tiriant mikrosatelitų nestabilumą, gali būti naudojama ir daugiau žymenų, be to, nuolat kuriami patikimesni dėl jų jautrumo ir specifiškumo mononukleotidiniai žymenys. Pavyzdžiui, *Promega Corporation* (JAV) sukūrė rinkinį, kurį sudaro mononukleotidiniai BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27 žymenys [15, 16]. Taip pat pradėti tirti naujai sukurti *Promega Corporation* žymenys – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59, kurie, tikimasi, bus jautresni mikrosatelitų nestabilumui nustatyti kituose nei storosios žarnos (ang. *extracolonic*) navikuose [17]. Todėl, siekiant pagrįsti naujų žymenų – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59 taikymą, būtina atlikti tų žymenų tyrimus palyginamuoju aspektu.

1.1. Darbo tikslas

Ištirti mikrosatelitų nestabilumo dažnį, pobūdį ir klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raišką sergant gimdos

kūno vėžiu ir gautus rezultatus susieti su pacienčių klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis bei jų išgyvenamumu.

1.2. Darbo uždaviniai

1. Nustatyti mikrosatelitų nestabilumo dažnį ir pobūdį tarp sergančiųjų gimdos kūno vėžiu, naudojant *Promega Corporation* (JAV) sukurtus du žymenų rinkinius (anksčiau sukurtą BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27 ir naująjį BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57, BAT-59).

2. Palyginti pacienčių, sergančių gimdos kūno vėžiu, mikrosatelitų nestabilumo dažnį ir pobūdį priklausomai nuo klinikinių-patologinių charakteristikų.

3. Ištirti klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) raišką gimdos kūno navikuose, kuriuose nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas.

4. Įvertinti mikrosatelitų nestabilumo įtaką pacienčių, sergančių gimdos kūno vėžiu, išgyvenamumui.

1.3. Ginamieji teiginiai

1. Naujasis žymenų – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59 rinkinys tiksliau parodo mikrosatelitų nestabilumą gimdos kūno vėžio atveju, palyginti su jau naudojamu žymenų – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27 rinkiniu.

2. Mikrosatelitų nestabilumo dažnis ir pobūdis yra susijęs su pacienčių, sergančių gimdos kūno vėžiu, klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis.

3. Siekiant objektyviau įvertinti genomo nestabilumą gimdos kūno navikuose, nepakanka atlikti vien imunohistocheminį tyrimą, kuris dažniausiai yra taikomas daugelio kitų lokalizacijų vėžio atvejais. Kartu tikslinga tirti ir tokius molekulinis žymenis kaip mikrosatelitų nestabilumas.

1.4. Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

1. Mikrosatelitų nestabilumui tirti buvo panaudoti nauji *Promega Corporation* sukurti žymenys – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59, kuriuos taikant dvigubai dažniau nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas gimdos kūno vėžio atveju, palyginti su nustatymo dažniu naudojant BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27 žymenų rinkinį.

2. Genomo nestabilumui įvertinti nepakanka vien tik imunohistocheminio tyrimo, tikslinga atlikti ir mikrosatelitų nestabilumo molekulinį tyrimą.

3. Imunohistocheminių ir molekulinų genomo nestabilumo tyrimų rezultatai padeda atrinkti pacientes tolesniems genetiniams tyrimams įtariant paveldimą gimdos kūno vėžį (Lynčo sindromą).

1.5. Autoriaus indėlis

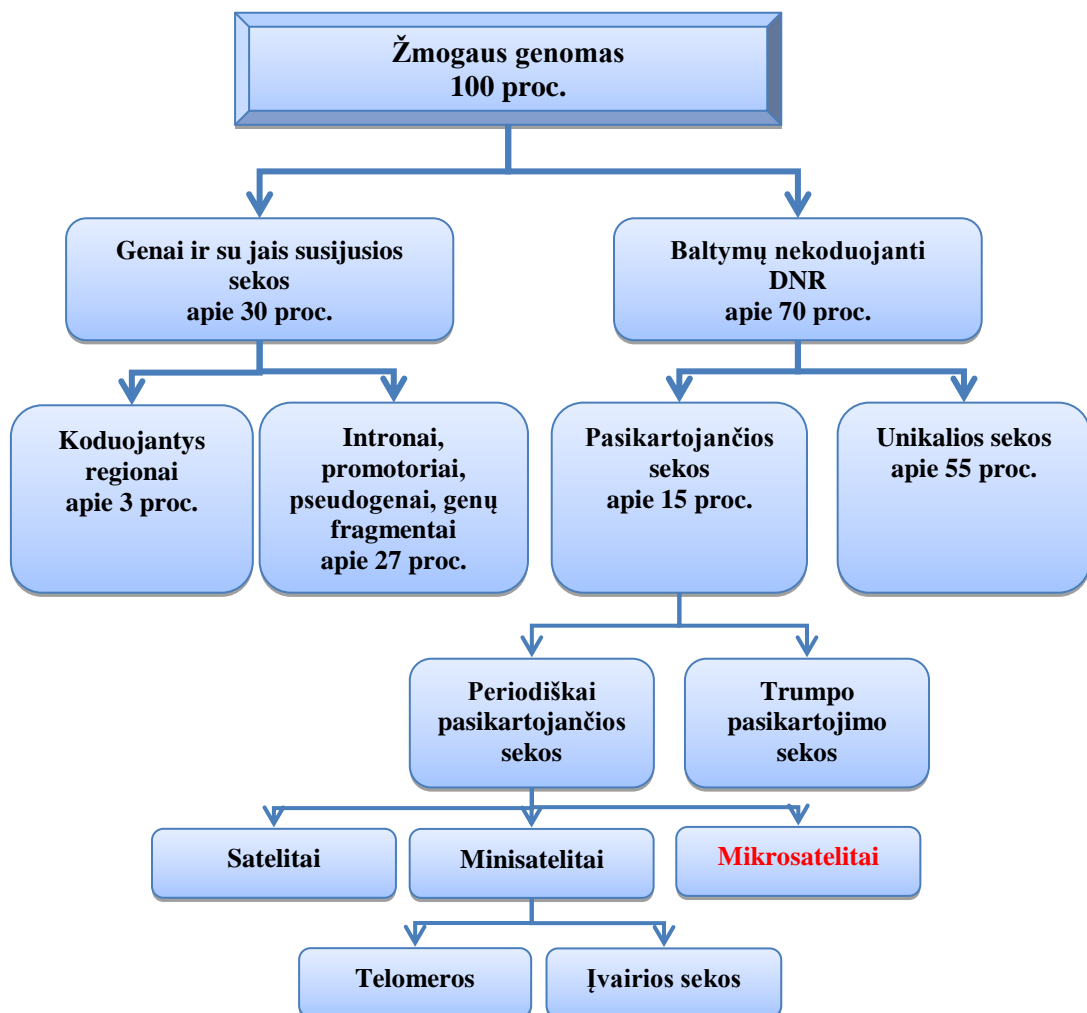
Šio darbo autorė parengė tyrimo protokolą bei visus reikalingus dokumentus Biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimui gauti. Disertantė atrinko pacientes, kurioms buvo diagnozuotas gimdos kūno vėžys bei rinko reikalingus duomenis apie jas. Vadovaudamasi darbo protokole numatytais kriterijais, autorė pildė medicininę dokumentaciją, taip pat dalyvavo kuriant kompiuterinę programą tiriamųjų pacienčių duomenims kaupti ir toliau vykdė jų stebėseną bei koordinavo mokslinio tyrimo eigą. Susipažino su mikrosatelitų nestabilumo nustatymo molekuliniais ir imunohistocheminiais tyrimo metodais. Atliko statistinę tyrimo duomenų analizę, interpretavo gautus rezultatus. Su bendraautoriais rengė mokslinius straipsnius ir tezes. Vykdomą mokslo darbą disertantė viešino stendiniais bei žodiniais pranešimais Lietuvos ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Mikrosatelitai ir jų nestabilumas

Panaudojus naujausius molekulinės biologijos ir genetikos pasiekimus sukurti modernūs genomo tyrimo metodai, įgalinantys įvairiais aspektais analizuoti DNR sekas ir nustatyti genetinius skirtumus tarp atskirų individų.

Žmogaus genomą sudaro koduojančios ir nekoduojančios DNR sekos. Baltymus koduojantys DNR regionai sudaro iki 3 proc. genomo, o nekoduojančios DNR sekos – iki 70 proc. genomo ir jų funkcinė paskirtis dažnai neaiški ir tebėra tiriama. Didžiausi skirtumai tarp žmonių nustatomi pagal įvairias kartotines DNR sekas (1 pav.) [18].



1 pav. Žmogaus genomo struktūra (modifikuota pagal [18])

Vienos iš kartotinių sekų – tai periodiškai pasikartojančios DNR sekos. Jos paprastai susideda iš paeiliui pasikartojančių sekų blokų, kurie vadinami genomiais vektoriais. Pagal genomio vektoriaus dydį kartotinių sekų sankaujų vektorius galima suskirstyti į tris pagrindines DNR grupes: satelitinės (palydovinės), minisatelinės ir mikrosatelinės.

Žmogaus satelitinė (palydovinė) DNR yra sudaryta iš labai didelių, paeiliui pasikartojančių DNR vektorių, kurių atskirą elementą sudaro 100–300 nukleotidų porų (np); minisatelinė DNR – iš vidutinio dydžio paeiliui pasikartojančių genominių vektorių, kuriuos sudaro paeiliui pasikartojančios 6–64 np. Mikrosatelinė DNR yra tandeminių pasikartojimų trumpi blokai (dažniausiai trumpesni nei 10 np), sudaryti iš 1–5 nukleotidų ir išsibarstę po visą žmogaus genomą [19]. Patys dažniausi yra dinukleotidinių pasikartojimų blokai, kurie sudaro iki 0,5 proc. genomo. Iš jų: CA/TG (C – citozinas, A – adeninas, T – timinas, G – guaninas) pasikartojimai yra dažniausi (1 kas 36 kn); retesni AT/TA (1 kas 50 kn) ir AG/CT (1 kas 125 kn) pasikartojimai ir gana reti CG/GC pasikartojimai (1 kas 10 Mn). Iš mononukleotidinių pasikartojimų dažniausi yra A ir T pasikartojimai [7].

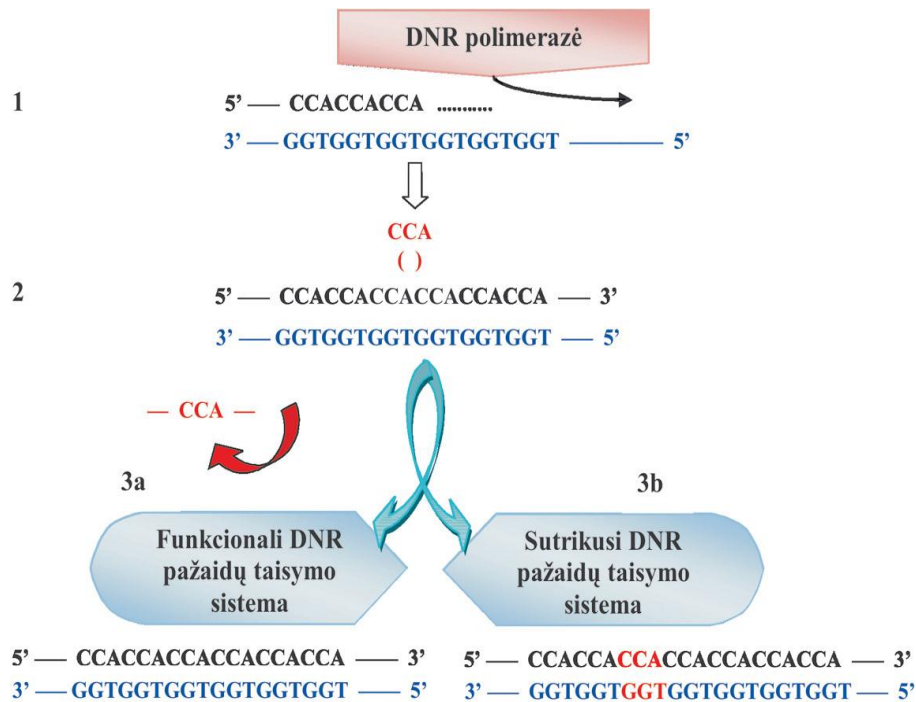
Mikrosatelinės DNR funkcija žmogaus genome dar nėra žinoma. Šios sekos randamos ir tarpgeninėje DNR, ir genuose.

Kiekvienas individas turi unikalų mikrosatelitų rinkinį, kurio pusę pagal Mendelio dėsnį perduoda savo palikuonims [6]. Šiuo metu individualiems genomui skirtumams analizuoti dažnai naudojami mikrosatelitai. Šių tyrimų plėtotę lėmė pasikartojančių DNR sekų palanki struktūra, kiekvienam individui būdingas skirtingas nukleotidų pasikartojimų skaičius ir didelis mikrosatelitų dažnis genome. Mikrosatelitų tyrimai dabar plačiai naudojami kriminalistikoje – žmogaus tapatybei nustatyti, medicinoje – chimerizmo tyrimams (transplantacijų efektyvumui vertinti), taip pat genomo nestabilumui ir su juo susijusių ligų rizikai vertinti.

Mikrosatelitų stabilumą (MSS; angl. *Microsatellite Stability*) rodo toks pats nukleotidinių sekų pasikartojimų skaičius to paties individo sveikame ir, pavyzdžiui, naviko audinyje. Mikrosatelitų nestabilumas (MSI; angl.

Microsatellite Instability) konstatuojamas tada, kai nukleotidinių sekų skaičius skirtinguose to paties individo audiniuose yra skirtingas. Taigi, mikrosatelitų nestabilumu vadinamos pažaidos mikrosatelitų sekose, atsiradusios dėl vieno ar daugiau pasikartojančių sekų iškritos ar intarpo; jos pasireiškia nenormaliai ilgais arba trumpais mikrosatelitais individo DNR ir gali būti ankstyvuoju kancerogenezės įvykiu [20].

Svarbiausias veiksnys, kuris lemia mikrosatelitų nestabilumą, yra pažaidos klaidingai suporuotų nukleotidų DNR taisymo sistemoje [21]. Ši sistema pakeičia klaidingai į grandinę įjungtus nukleotidus, trukdo vykti dviejų neidentiškių grandinių rekombinacijai. DNR replikacijos mechanizmas vyksta nuolat ir veikia gana tiksliai dėl DNR polimerazėse integruoto „taisymo“ mechanizmo. Nepaisant to, replikacijos klaidų nors ir nedažnai, tačiau pasitaiko ir apskaičiuota, kad jų dažnis gali būti nuo $1/10^6$ iki 10^7 np [22]. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistema yra atsakinga už replikacijos klaidų taisymą ir jeigu jos veikla nesutrikusi, ji gali sumažinti klaidų dažnį iki $1/10^7$ np ir padidinti replikacijos tikslumą nuo 1 tūkst. iki 10 tūkst. kartų. Esant sutrikusiai klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemai, klaida neištaisoma ir atsiranda mikrosatelitų nestabilumas (2 pav.).



1 – DNR replikacija; 2 – CCA seka klaidingai įjungta į besireplikuojančią grandinę;
 3a – klaida yra ištaisoma klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos fermentų; 3b – klaida nėra ištaisoma ir atsiranda mikrosatelitų nestabilumas.

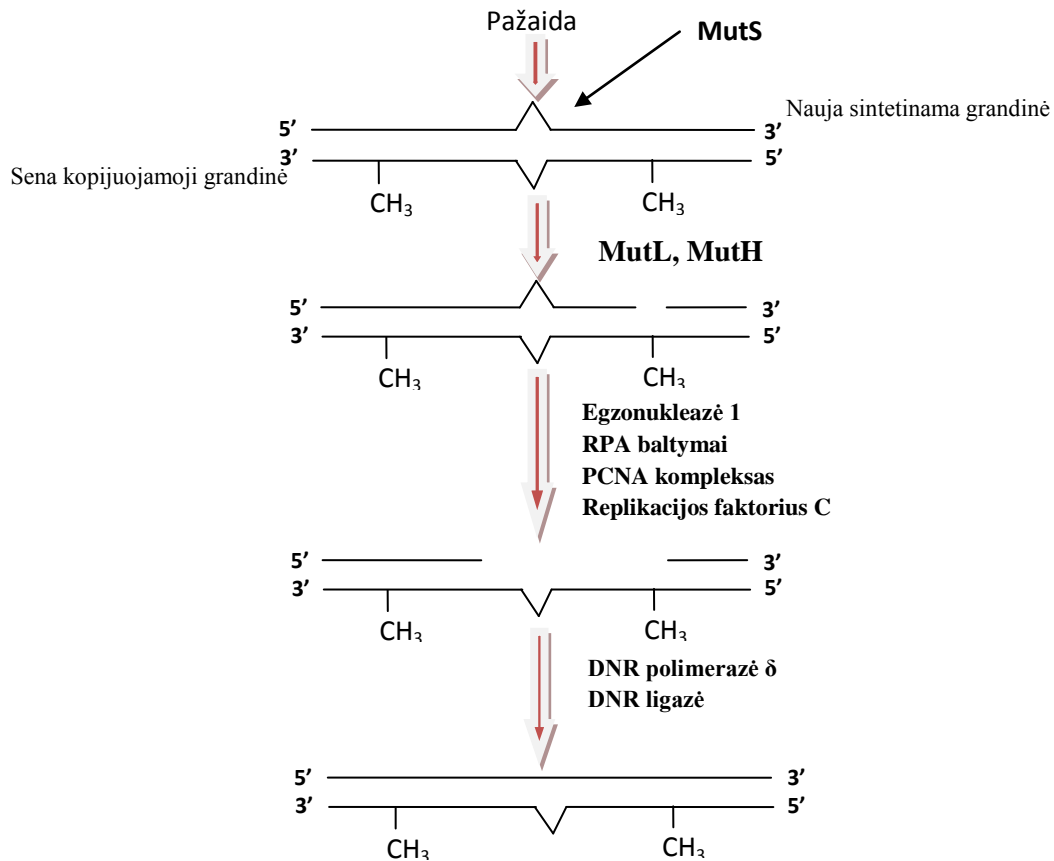
A – adeninas; C – citozinas; G – guaninas; T – timinas.

2 pav. Mikrosatelitų nestabilumo mechanizmas (modifikuota pagal [23])

Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistema yra DNR taisymo būdas, veikęs prokariotuose ir išlikęs eukariotuose, taip pat žmonėse. Geriausiai ši sistema išanalizuota *Escherichia coli* bakterijoje. Šių bakterijų klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymai yra skirstomi į MutS, MutL ir MutH (3 pav.).

Minėtos sistemos mechanizmą galima suskirstyti į 5 etapus:

- neatitikimo atpažinimas;
- reikiamų nukleotidų ir papildomų veiksmų surinkimas;
- (blogos) koduojančios sekos „išmetimas“;
- neteisingos dukterinės koduojančios sekos fragmento degradacija (sunaikinimas);
- DNR resintezė.



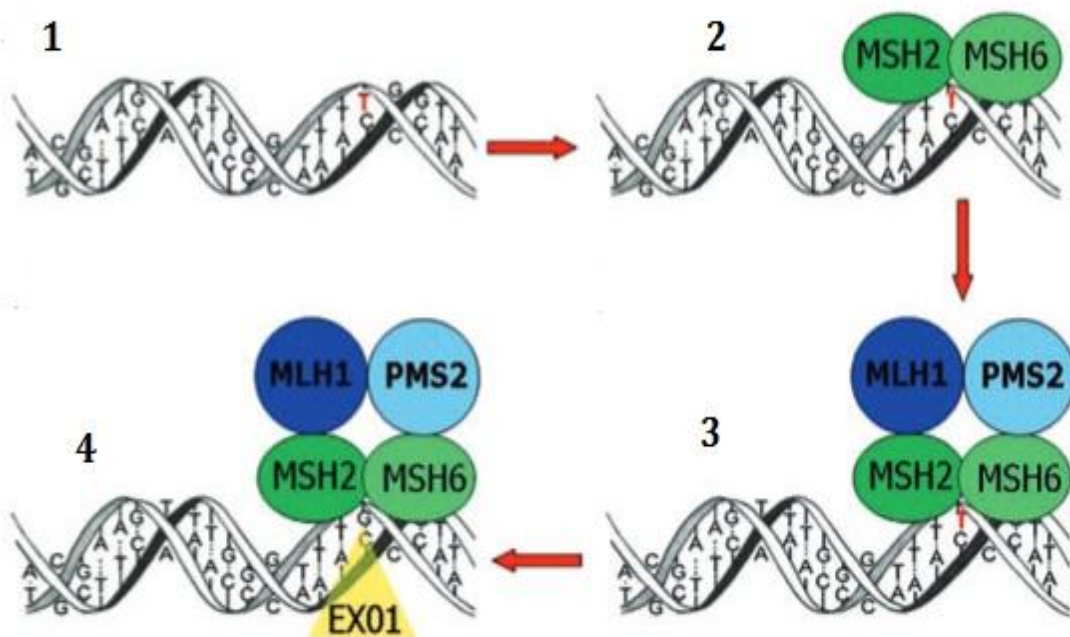
MutS – prokariotinės klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymas, sąveikaujantis su DNR klaidos vietoje; MutL – prokariotinės klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymas, sąveikaujantis su MutS ir MutH baltymais; MutH – prokariotinės klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymas – endonukleazė, įkerpanti (nemetilintą) DNR grandinę netoli klaidos vietos; Egzonukleazė I – egzonukleazė, dalyvaujanti taisant DNR pažaidas, degraduojanti klaidingą DNR grandinę 5'→3' kryptimi; RPA baltymai – replikacijos baltymo A homologai (ang. *Replication Protein A*), sąveikaujantys su vienagrande DNR, dalyvaujantys DNR pažaidų taisyme; PCNA kompleksas – proliferuojančios ląstelės branduolio antigeno (angl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) kompleksas, dalyvaujantis DNR pažaidų taisyme; Replikacijos faktorius C – dalyvauja PCNA kompleksą prijungiant prie DNR jos trūkio vietoje; DNR polimerazė δ – fermentas, sintetinantis naują DNR grandinę klaidos vietoje; DNR ligazė – fermentas, sujungiantis DNR grandinės galus trūkio vietoje.

3 pav. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistema

(modifikuota pagal [24])

Eukariotuose MutS atitikmenys-homologai (baltymai, kurių panašios evoliucijos šaknys) žmogaus baltymams yra MSH2, MSH3 ir MSH6, MutL atitikmenys – MLH1 baltymas ir „vėlyvosios mejozės segregacijos“ pogrupio baltymai – PMS1 ir PMS2.

Minėti baltymai citoplazmoje jungiasi į vadinamuosius heterodimerus (heterodimeras – molekulė, susidedanti iš skirtingų subvienetų arba nesujungtų monomerų): MSH2 formuoja heterodimerą su MSH6 ir šis kompleksas, slinkdamas išilgai DNR, ieško vieno ar kelių nukleotidų delecijų/intarpų arba pavienių nukleotidų neatitikimų. Nustatęs pažaidą, šis kompleksas jungiasi prie MLH1/PMS2 heterodimero ir sudaro keturių baltymų kompleksą, kuris suaktyvina egzozonukleazę 1 ir atlieka DNR pažaidų taisymą (4 pav.) [25].



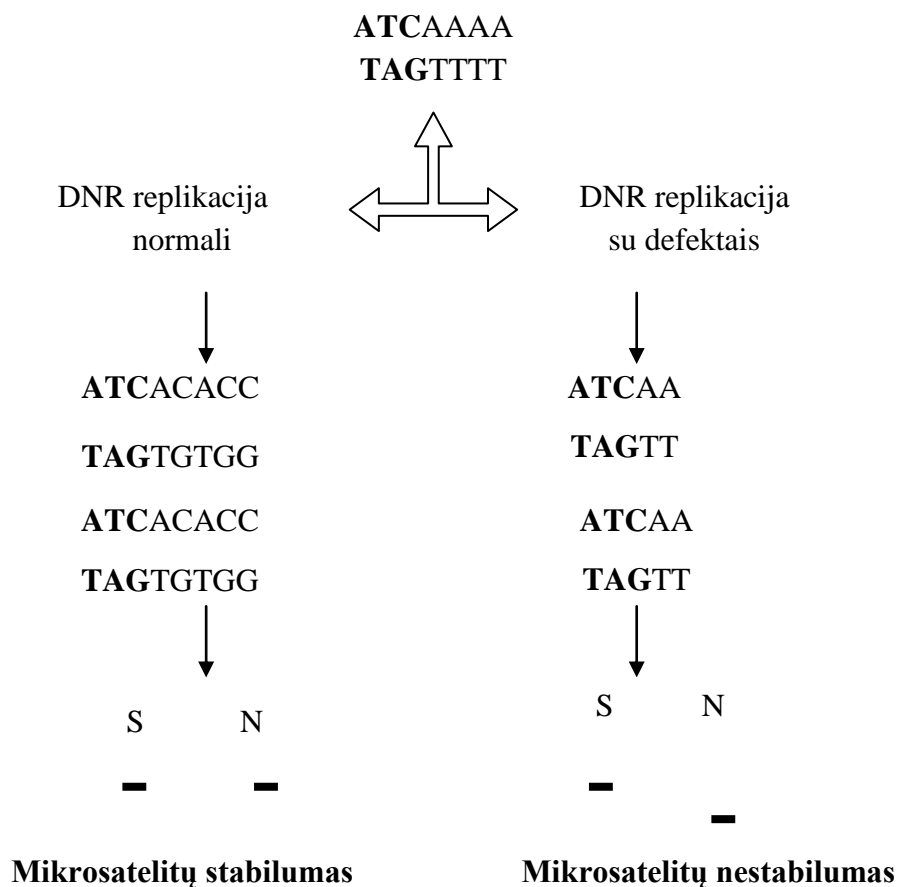
DNR replikacijos metu gali susidaryti vieno ar kelių nukleotidų iškritos arba pavienių nukleotidų neatitikimai. Pavyzdžiui: (1) susidarė pavienio nukleotido (G>T) neatitikimas. (2) MSH2 ir PMS6 sudaro heterodimerą ir atpažįsta neatitikimą. (3) MLH1/PMS2 jungiasi su MSH2/MSH6 į kompleksą. (4) kompleksas suaktyvina egzozonukleazę 1 (EXO1) ir ištaiso DNR pažaidą. MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS1 ir PMS2 – klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymai.

4 pav. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistema

(modifikuota pagal [25])

Jeigu kuris nors iš keturių pagrindinių baltymų (MSH2, MLH1, MSH6 arba PMS2) yra funkciškai neaktyvus, DNR pažaidos nebus ištaisomos. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos defektai padidina mutacijų dažnį, o tai turi įtakos ląstelių augimo kontrolei.

Esant defektui klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemoje mutacijos dažniausiai pasireiškia mikrosatelitų nestabilumu. Todėl to paties individo navikinių ląstelių DNR (esant minėtos sistemos defektui) gali turėti skirtingas mikrosatelitų sekas, palyginti su sveiko audinio DNR; dažniausiai pasikartojimų skaičius sumažėja, tačiau kartais gali ir padidėti (5 pav.). Taigi, mikrosatelitų nestabilumas yra svarbus klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos defekto žymuo, padedantis iš anksto atrinkti pacientus, kuriems reikalingi šios sistemos genų mutacijų tyrimai.



Kai navikinių ląstelių klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistema yra funkcionali, mikrosatelitų sekos bus vienodos to paties individo tiek sveikame

(S), tiek navikiniame (N) audinyje. Tais atvejais, kai navikinės ląstelės turi pažeistą minėtą sistemą, mikrosatelitų sekos navikiniame (N) audinyje skiriasi (dažniausiai tampa trumpesnės), palyginti su mikrosatelitų sekomis sveikame (S) audinyje. A – adeninas, T – timinas, C – citozinas, G – guaninas.

5 pav. Mikrosatelitų stabilumo ir nestabilumo pavyzdys

(modifikuota pagal [25])

Kai įvyksta plačiai išplitusios didelę genomo sritį apimančios DNR genetinės mutacijos, kurios nebegali būti ištaisytos, klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymai inicijuoja apoptozę. Esant šios sistemos neveiklumui, apoptozės tempas ir dažnis mažėja, suteikdamas privalumą mutavusioms ląstelėms lengviau išgyventi. Todėl funkcionalus minėtos sistemos mechanizmas yra itin svarbus genomo stabilumui išsaugoti.

Genomo nestabilumas yra beveik universali navikinių ląstelių savybė. Nestabilumas būtinas tam, kad ląstelė galėtų sukaupti pakankamai mutacijų. Genomo nestabilumas gali būti dviejų tipų:

- chromosomų nestabilumas – dažniausia forma. Navikinių ląstelių kariotipas dažniausiai būna labai pakitęs, jam būdinga dauginės papildomos ir prarastos chromosomos, daugelis persitvarkymų ir t.t.

- mikrosatelitų nestabilumas – DNR lygmens nestabilumas.

Navikams dažniausiai būdingas vienas arba kitas nestabilumo tipas, bet ne abu iš karto, dėl to galima manyti, kad nestabilumas nėra tiksliai atsitiktinumas, bet kartu ir ląstelių gebėjimo išgyventi rezultatas.

Reikia pažymėti, kad mikrosatelitų nestabilumas gali atsirasti ne tik dėl klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos genų mutacijų, bet ir dėl somatinių pažaidų, dažniausiai dėl *MLH1* geno promotoriaus hipermetilinimo [26, 27]. DNR metilinimas yra epigenetinė DNR modifikacija, kuri specifiškai nukreipta į citozino liekaną CpG (sekos, kuriose dažni citozino-guanino porų pasikartojimai) dinukleotiduose. Genomo regionai, kuriuose didelis CpG dinukleotidų dažnis, yra vadinami CpG salomis ir dažniausiai apie 40 proc. atvejų jų yra žmogaus genų promotoriuose,

įskaitant ir *MLH1* geną. *MLH1* promotoriaus CpG salų hipermetilinimas gali slopinti šio geno mutacijas. Jeigu abi šio geno kopijos yra nuslopintos (dažniausiai dėl abiejų alelių hipermetilinimo), *MLH1* geno funkcija gali sutrikti ir sukelti klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos defektą, dėl to gali išsivystyti mikrosatelitų nestabilumu pasižymintis navikas. Todėl tokie navikai, kuriuose nustatomi *MLH1* baltymo raiškos pokyčiai, turėtų būti papildomai tiriami dėl *MLH1* hipermetilinimo, siekiant įvertinti minėtus mechanizmus. Teoriškai sporadinis kitų klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos genų hipermetilinimas taip pat galėtų būti, tačiau tai nėra įrodyta klinikiniais tyrimais.

Genomo nestabilumo tyrimai ypač svarbūs onkologijoje siekiant išsiaiškinti įvairius kancerogenezės aspektus, numatyti ligos prognozę ir įvertinti atsaką į gydymą [28].

Mikrosatelitų nestabilumui nustatyti naudojami įvairūs metodai, kurių esmė – aptikti pokyčius pasirinktose genomo srityse, lyginant tiriamojo paciento skirtingų audinių (naviko ir sveiko audinio) ląstelių genomus. Dažniausiai atliekamas pasirinktos genomines srities amplifikavimas, panaudojant polimerazės grandininę reakciją (PGR), ir susidariusių fragmentų ilgio nustatymas. Tam naudojami kapiliarinės elektroforezės principu veikiančios genetiniai analizatoriai bei mikrosatelitų žymenų rinkiniai, kurie panašūs į žmogaus tapatybės nustatymo rinkinius. Kadangi elektroforezinis fragmentų judrumas ne visuomet priklauso tik nuo fragmento ilgio, kuriami ir kiti metodai, kurie pagrįsti realaus laiko PGR principu (RT-PCR; angl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*). R. Janavičius ir bendraautoriai [29] pasiūlė besiskiriančių DNR grandinių lydymosi temperatūrų skirtumais pagrįstą metodą (HRM; angl. *High resolution melting analysis*), kuris autorių teigimu, tinkamas mikrosatelitų nestabilumui nustatyti.

Mikrosatelitų nestabilumui vertinti 1998 metais JAV nacionalinis vėžio institutas pasiūlė tirti penkias genomo sritis ir naudoti penkių žymenų rinkinį, žinomą kaip Bethesda rinkinį, kurį sudaro du mononukleotidų žymenys (BAT-25 ir BAT-26) ir trys dinukleotidų žymenys (D2S123, D5S346 ir

D17S250) [14]. Dėl mažo dinukleotidinių žymenų specifiškumo *Promega Corporation* (JAV) sukūrė naują rinkinį, kurį sudaro BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27 mononukleotidiniai žymenys [30]. Tarp *Promega Corporation* žymenų taip pat yra du pentanukleotidiniai žymenys (*Penta C* ir *Penta D*), kurie naudojami kaip pavyzdžio (mėginio) identifikacijos žymenys siekiant užtikrinti, kad naviko ir sveiko audinio DNR būtų išskirti iš to paties paciento.

Reikia pažymėti, kad ieškoma dar tikslesnių žymenų mikrosatelitų nestabilumui analizuoti. Neseniai pradėti tirti nauji *Promega Corporation* sukurti žymenys – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57, BAT-59, kurie skirti mikrosatelitų nestabilumui tirti kitų, nei storosios žarnos, lokalizacijų navikuose [17].

Mikrosatelitų nestabilumui vertinti iki šiolei vadovaujamosi JAV nacionalinio vėžio instituto rekomendacijomis [14]:

- mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas (MSI-H; angl. *Microsatellite Instability-High*), jei 30 proc. ir daugiau iš tirti pasirinktų genomo vietų (paprastai tiriamos 5–7 vietos) arba ≥ 2 iš 5 naudotų žymenų nustatyta mikrosatelitų skirtumų;
- mikrosatelitų mažo dažnio nestabilumas (MSI-L; angl. *Microsatellite Instability-Low*), kai minėtų mikrosatelitų skirtumų nustatyta mažiau nei 30 proc. analizuotų genomo vietų arba < 2 iš 5 naudotų žymenų;
- mikrosatelitų stabilumas (MSS; angl. *Microsatellite Stability*), kai skirtumo tarp mikrosatelitų sekų nenustatyta nė vienoje iš analizuotų genomo vietų.

Reikia taip pat pažymėti, kad, sukūrus monokloninius antikūnus prieš tam tikrus klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymus, vis daugiau tyrimų atliekama mikrosatelitų nestabilumo fenotipui įvertinti naudojant imunohistocheminius tyrimo metodus [31]. Šiais metodais galima nustatyti MLH1, MSH2, MSH6 ir PMS2 baltymų raišką. Jei navike nenustatoma bent vieno klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo

sistemos baltymo raiškos, tai rodo atitinkamo geno pokytį ir minėtos sistemos neveiklumą. Palyginti su molekuliniais biologiniais metodais, imunohistocheminis tyrimas yra paprastesnis ir pigesnis, jo jautrumas yra apie 92 proc., specifiškumas – beveik 100 proc., kas, pavyzdžiui, buvo parodyta tiriant storosios žarnos navikus [32].

Įvairių autorių duomenimis, tiek mikrosatelitų nestabilumo tyrimai, tiek imunohistocheminiai tyrimai gali būti taikomi atskirai (pvz., dėl finansinių išteklių ribotumo, mėginių parinkimo ir kt.), bet, tikėtina, kad informatyviausi rezultatai turėtų būti gaunami derinant abu šiuos tyrimo metodus.

2.2. Mikrosatelitų nestabilumas sergant įvairių lokalizacijų vėžiu

Vėžio formavimosi teorijose nagrinėjami du genominio nestabilumo aspektai – heterozigotiškumo praradimas ir mikrosatelitų nestabilumas. Mikrosatelitų nestabilumą sąlygoja klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos sutrikimai.

Vienu ar kitu keliu formuojantis mikrosatelitų nestabilumui (tai reiškia ir genomo nestabilumui) atsiranda priežasčių tolesniems genų pažeidimams. Reikia pažymėti, kad nukleotidų intarpai/iškritos tiek mikrosatelitų sekose, tiek kitose genomo vietose gali lemti vėžiui formotis svarbių genų pažeidimus.

Mikrosatelitų nestabilumas tyrinėjamas įvairių lokalizacijų navikų atvejais. Toliau apžvelgsime literatūros duomenis šiuo klausimu.

Mikrosatelitų nestabilumas nustatomas sergant galvos ir kaklo plokščialąsteline karcinoma. Šios ligos atveju heterozigotiškumo praradimas būdingesnis nei mikrosatelitų nestabilumas. Pavyzdžiui, atliekant vieną tyrimą (n=80) mikrosatelitų mažo dažnio nestabilumas nustatytas tik 2 proc. atvejų [33], o kitą – 7,7 proc. atvejų (n=91) [34]. Sergant burnos plokščialąsteline karcinoma (n=25) mikrosatelitų nestabilumas nustatytas 20 proc., o heterozigotiškumo praradimas – 64 proc. pacientų [35]. Kitų tyrimų metu 85 proc. atvejų (n=27) nustatytas heterozigotiškumo praradimas ir tik 7 proc. –

mikrosatelitų nestabilumas [36]. Dėl mikrosatelitų nestabilumo klinikinės reikšmės sergant šių lokalizacijų navikais dar abejojama [33]. Heterozigotiškumo praradimas turi prognozinę vertę, o dėl šių biologinių žymenų predikcinės reikšmės, vertinant atsaką į gydymą, tebediskutuojama [33].

Mikrosatelitų nestabilumas ir heterozigotiškumo praradimas susiję ir su krūties kancerogeneze. Yra duomenų, kad mikrosatelitų nestabilumas susijęs su blogesne ligos prognoze esant išplitusiam krūties vėžiui: pacienčių (n=39), kurioms buvo taikoma didelių dozių citostatinė terapija ir autologinė kamieninių ląstelių transplantacija, esant mikrosatelitų nestabilumui, gyvenimo trukmė buvo trumpesnė, palyginti su pacienčių, kurioms mikrosatelitų nestabilumo nerasta, gyvenimo trukme [37]. Be to, atskirais atvejais nustatytas ir navikų atsparumas chemoterapijai. Reikia pažymėti, kad mikrosatelitų nestabilumas ženkliai dažniau būna sergant abiejų krūčių vėžiu [38]. Tiriant ne tik piktybinius krūties navikus, bet ir nepiktybinius (fibroadenomas, atipines hiperplazijas, hiperplazijas nesant atipijos) nustatyta, kad mikrosatelitų nestabilumas bei heterozigotiškumo praradimas androgenų receptoriaus *AR* gene nėra būdingi nepiktybiniams krūties navikams, tačiau gali turėti įtakos atipinei hiperplazijai progresuoti iki agresyvių fenotipų [39].

Duomenys apie mikrosatelitų nestabilumą sergant plaučių vėžiu nėra vienareikšmiai. Tiriant pacientus (n=47), sergančius I ir II stadijų nesmulkialąstelinio plaučių vėžiu, mikrosatelitų nestabilumas nustatytas 19,1 proc. atvejų, o heterozigotiškumo praradimas – 34,0 proc. atvejų [40]. Reikia pažymėti, kad visuose navikuose, kuriuose aptiktas mikrosatelitų nestabilumas, klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos genų produkto baltymų (MSH2, MSH6, MLH1) raiška buvo normali. Konstatuota koreliacija tarp mikrosatelitų nestabilumo, heterozigotiškumo praradimo ties *p53* vieta ir naviko metastazavimo į limfinius mazgus [40]. Kito tyrimo duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas bei heterozigotiškumo praradimas nustatyti 55 proc. sergančiųjų plaučių vėžiu ir 4,5 proc. sveikų asmenų kraujyje, plazmoje ir skrepliuose [41]. Vykdomi tyrimai siekiant

išsiaiškinti mikrosatelitų reikšmę prognozuojant minėtos ligos eigą. Mikrosatelitų pokyčiai, tirti iškvėpiamo oro kondensato DNR, rodė blogesnę sergančiųjų nesmulkiašteliniu plaučių vėžiu ligos prognozę [42]. Tiriant metastazuojančius plaučių karcinoidus, juose chromosomų nestabilumas, palyginti su nemestazuojančių karcinoidų chromosomų nestabilumu, konstatuojamas dažniau [43].

Pastaraisiais metais daugėja tyrimų, kurių tikslas analizuoti mikrosatelitų nestabilumo vaidmenį sergant skrandžio vėžiu [44, 45]. Nustatyta, kad mikrosatelitų nestabilumo dažnis ženkliai didesnis, kai pacientų šeiminėje anamnezėje yra skrandžio vėžys, palyginti su tais atvejais, kai paciento šeimoje buvo sergančiųjų kitų lokalizacijų piktybiniais navikais arba šeiminė vėžio anamnezė buvo neigiama [46]. Klinikiniu aspektu reikšmingi duomenys, rodantys sąsają tarp mikrosatelitų nestabilumo būklės ir klinikinių-patologinių charakteristikų. Reikia pažymėti, kad, sergant skrandžio karcinoma, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatomas vyresnio amžiaus pacientams, kai navikas lokalizuojasi distalinėje skrandžio dalyje bei esant žarniniam histologiniam naviko potipiui [47, 48].

Duomenų apie mikrosatelitų nestabilumą sergant inkstų navikais nėra daug. Ištyrus pacientus, sergančius daugine cistine inksto ląstelių karcinoma, heterozigotiškumo praradimas nustatytas 27 proc. atvejų, o mikrosatelitų nestabilumas – 18 proc. atvejų [49]. Analizuojant klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo genų *MLH1* ir *MSH2* reikšmę sporadinių inksto ląstelių karcinomų atveju, konstatuota, kad minėtų genų funkcijos praradimas nesusijęs nei su promotoriaus metiliniu, nei su mutacija jų egzonuose; heterozigotiškumo praradimas rodo chromosomų nestabilumą dideliuose DNR fragmentuose – tai, matyt, pagrindinis genetinis pokytis esant inksto ląstelių karcinomai.

Mikrosatelitų nestabilumo tyrimai yra svarbūs šlapimo pūslės vėžio atvejais diagnostiniu ir prognoziniu aspektais. Mikrosatelitų nestabilumas ir heterozigotiškumo praradimas nustatyti ląstelėse, gautose iš šlapimo nuosėdų, esant paviršiniams šlapimo pūslės navikams, taip pat esant gerai (G1) ir

vidutiniškai (G2) diferencijuotiems navikams [50]. Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas taip pat aptiktas esant vėlyvųjų stadijų (40,6 proc. atveju) bei vidutiniškai (G2) ir blogai (G3) diferencijuotiems navikams (59,4 proc.) [51]. Reikia pažymėti, kad mikrosatelitų nestabilumas yra ženkliai dažnesnis ligos atsinaujinimo atveju. Manoma, kad mikrosatelitų nestabilumo testas gali būti nepriklausomas prognozinis žymuo sergant šlapimo pūslės navikais. Mikrosatelitų nestabilumas sergant šios lokalizacijos vėžiu, tyrinėtas ir Vilniaus universiteto Onkologijos institute (dabar Nacionalinis vėžio institutas). Panaudojus penkis mikrosatelitų sekų žymenis – CYAR04, D5S818, D13S317, I-FABP ir TH-01, šių sekų pokyčiai nustatyti šlapimo pūslės navikuose 48 proc. (n=25) atveju. Ištyrus 5 genomo vietas dažniausiai mikrosatelitų sekų pokyčiai buvo aptikti panaudojus CYAR04 žymenį. Mikrosatelitų sekų pokyčių įtakos berecidyvio laikotarpio trukmei nenustatyta [52]. Tolesni tyrimai turėtų būti tęsiami siekiant atsakyti į klausimą, ar tie pokyčiai susiję su mikrosatelitų nestabilumu, ar su didesnių genomo dalių pažaidomis ir, ar mikrosatelitų nestabilumas gali būti naudingas aiškinantis atsaką į gydymą bei vertinant ligos prognozę.

Mikrosatelitų nestabilumas sergant priešinės liaukos vėžiu nėra dažnas [53]. Nustatyta, kad padidėjusi klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos geno MSH2 baltymo raiška bei esantys *p53* pokyčiai sąlygoja blogesnę ligos prognozę. Padidėjusi PMS2 raiška nustatyta esant priešinės liaukos karcinomai *in situ* bei priešinės liaukos vėžiui [54].

Mikrosatelitų nestabilumas tyrinėtas ir sergant onkoginekologinėmis ligomis. Pavyzdžiui, apibendrinus įvairių tyrimų duomenis, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas 12 proc. tirtų kiaušidžių navikų (n=977). Kiaušidžių navikų, turinčių sutrikusią klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemą, grupę (n=159) sudarė įvairių histologinių potipių epiteliniai kiaušidžių navikai. Nustatyta sąsaja tarp navikų histologinio potipio ir minėtos sistemos sutrikimo: šios sistemos sutrikimai būdingi serozinio potipio navikams [55]. Kuris iš genomio nestabilumo mechanizmų – chromosomų ar mikrosatelitų – svarbesnis kiaušidžių kancerogenezeje, dar

nėra aišku, todėl manoma, kad tarp šių kancerogenezės kelių yra glaudi sąveika [56]. Esant G3 kiaušidžių adenokarcinomai, konstatuota mikrosatelitų nestabilumas bei *KRAS* mutacijos, o esant G1 navikui – padidėjusi *p53* raiška [57]. Tyrinėjant sąsają tarp mikrosatelitų nestabilumo ir sporadinio kiaušidžių vėžio klinikinių-patologinių charakteristikų, mikrosatelitų nestabilumas nustatytas 8–16 proc. atvejų [58]. Sąsajos tarp mikrosatelitų nestabilumo ir naviko histologinio tipo bei ligos stadijos nerasta [59]. Neaišku, ar mikrosatelitų nestabilumas gali atlikti prognozinio žymens vaidmenį sergant šios lokalizacijos vėžiu [60].

Literatūros duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas sergant gimdos kaklelio vėžiu svyruoja nuo 7,0 iki 25,4 proc. [61, 62]. Tyrinėjama sąsaja tarp mikrosatelitų nestabilumo ir sergančiųjų gimdos kaklelio vėžiu klinikinių-patologinių charakteristikų. Pavyzdžiui, ištyrus sergančiąsias I-II stadijų gimdos kaklelio vėžiu (n=58), statistiškai reikšmingos sąsajos tarp mikrosatelitų nestabilumo ir naviko diferenciacijos laipsnio, ligos stadijos arba pacienčių amžiaus nenustatyta [63]. Ar mikrosatelitų nestabilumas daro įtaką kancerogenezei persistuojant žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcijai, nėra aišku. Ištyrus mikrosatelitų nestabilumą sergant gimdos kaklelio plokščialąsteline karcinoma 12 proc. atvejų (n=50) nustatytas mikrosatelitų mažo dažnio nestabilumas, o 14 proc. – didelio dažnio [64]. Sąsajos tarp ŽPV infekcijos ir mikrosatelitų nestabilumo nerasta, tik, esant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumui, nustatyta jo koreliacija su vėlyvosiomis ligos stadijomis. Esant mikrosatelitų dažnam nestabilumui pacienčių išgyvenamumas buvo blogesnis, palyginti su išgyvenamumu tų pacienčių, kurioms konstatuotas mikrosatelitų stabilumas. Šio tyrimo duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas gali būti susijęs su naviko progresija ir, matyt, blogesne gimdos kaklelio vėžio prognoze. Mikrosatelitų nestabilumas nebuvo susijęs su atsaku į gydymą cisplatiną [65].

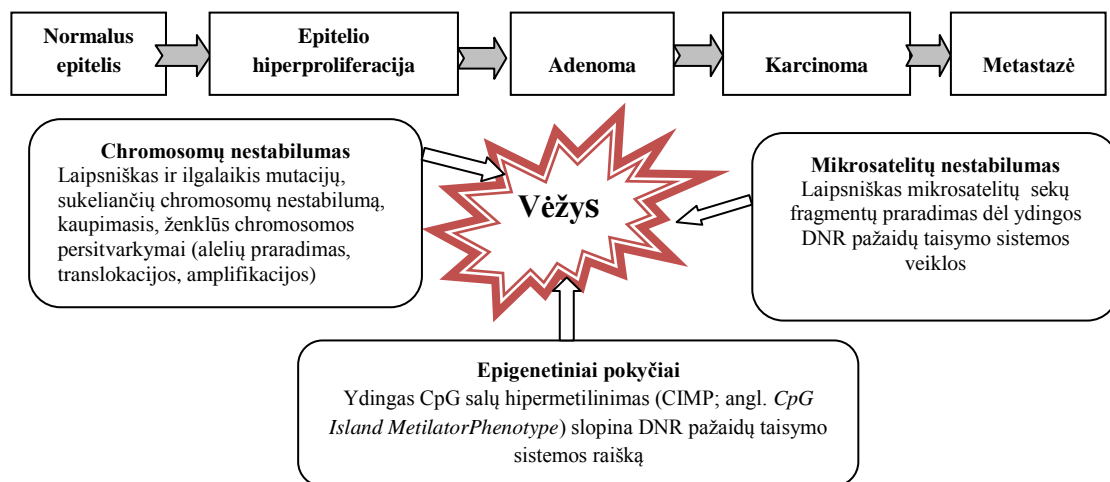
Nevienareikšmiai duomenys gauti tyrinėjant sąsają tarp mikrosatelitų nestabilumo ir klinikinių-patologinių charakteristikų (pvz., pacientų amžiaus, kūno masės indekso, naviko histologinio tipo, diferenciacijos laipsnio, ligos

stadijos ir kt.). Tiriama, ar mikrosatelitų nestabilumas gali būti predikcinis bei prognozinis žymuo.

Taigi kaupiama vis daugiau duomenų, įrodančių, jog mikrosatelitų nestabilumas turi įtakos atskirų organų kancerogenezei, o mikrosatelitų sekų tyrimų duomenys netgi tais atvejais, kai mikrosatelitų nestabilumas nėra siejamas su naviko formavimusi, yra svarbūs ligai kontroliuoti (prognozininiu ir predikciniu aspektu). Reikia pažymėti, kad daugiausia duomenų yra apie mikrosatelitų nestabilumą sergant storosios žarnos vėžiu. Mikrosatelitų nestabilumo tyrimas diegiamas kaip atrankinės patikros testas dėl paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio. Esant šiai patologijai, 15–75 proc. padidėja storosios žarnos ir gimdos kūno vėžio rizika, kitų lokalizacijų vėžio rizika padidėja < 15 proc. Detaliau tai apžvelgiame tolesniame skyriuje.

2.3. Mikrosatelitų nestabilumas ir Lynčo sindromas

Mikrosatelitų nestabilumo fenotipas pirmą kartą nustatytas 1993 metais storosios žarnos vėžio atveju, tiek sporadinio, tiek ir paveldimo [9, 10]. Reikia pažymėti, kad storosios žarnos kancerogenezės mechanizmai gali būti siejami ir su mikrosatelitų, ir su chromosomų nestabilumu (6 pav.).



6 pav. Galimi storosios žarnos kancerogenezės scenarijai

Vienas iš galimų kancerogenezės mechanizmų yra chromosomų nestabilumas, kuris nulemtas laipsniško mutacijų kaupimosi (chromosomų struktūros persitvarkymai, tokie kaip alelių funkciniai sutrikimai – heterozigotiškumo praradimas, translokacijos, amplifikacijos, iškritos). Dėl genomo persitvarkymo vyksta pokyčiai onkogenuose (pvz., *KRAS*, *c-CRB2*, *c-MYC*), navikų slopiklių genuose (pvz., *APC*, *DDC*, *p53*) ir genuose, atsakinguose už ląstelės ciklo reguliaciją ir apoptozę (*BAX*, *BCL2*, *COX2*, *PTEN* ir kt.), o tai sąlygoja nereguliuojamą storosios žarnos epitelio augimą, vėliau – vėžio išsivystymą [21, 66]. Tokie genetiniai pokyčiai nustatyti iki 85 proc. visų storosios žarnos vėžio atvejų.

Kitas kancerogenezės kelias susijęs su mikrosatelitų nestabilumu ir būdingas iki 15 proc. visų storosios žarnos vėžio atvejų [67, 68]. Reikia pažymėti, kad mikrosatelitų nestabilumas paveldimo storosios žarnos vėžio ir sporadinio vėžio atvejais formuojasi dėl skirtingų mechanizmų. Esant paveldimam nepolipoziniam storosios žarnos vėžiui (HNPCC; angl. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) priežastis glūdi DNR pažaidų taisymo genų paveldimose mutacijose [21], o mikrosatelitų sekų nestabilumas esant sporadiniam storosios žarnos vėžiui dažniausiai susijęs su klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo genų raiškos praradimu, sąlygojamu epigenetinio slopinimo – ydingo CpG salų hipermetilinimo [23]. Kadangi CpG salų metilinimas dažniausiai nustatomas tais atvejais, kai nėra chromosomų nestabilumo, galima teigti, kad epigenetinis ir genetinis keliai yra nepriklausomi.

Plačiai tyrinėjama mikrosatelitų nestabilumo reikšmė klinikinėje praktikoje. Kaip jau buvo minėta, šis testas svarbus ne tik patikrai dėl paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio (Lynčo sindromo) [21], bet taip pat gali būti prognozinis ir predikcinis veiksnis esant sporadiniam storosios žarnos vėžiui [69–71]. Pastaruoju atveju mikrosatelitų nestabilumas buvo identifikuotas kaip nepriklausomas prognozinis veiksnys ir dažniau nustatytas vyresniame amžiuje bei moterims, taip pat dažniau – proksimalinėje storosios žarnos dalyje ir buvo susijęs su kai kuriais klinikiniais-patologiniais

parametrais (mucininiu naviko histologiniu tipu, žemesniu metastazavimo potencialu ir kt.). Navikuose esant mikrosatelitų nestabilumui ligos prognozė yra geresnė, palyginti su tais atvejais, kai navikuose mikrosatelitai yra stabilūs [72, 73]. Mikrosatelitų nestabilumo kaip atsako į chemoterapinį gydymą predikcinio žymens reikšmė vertinama prieštaringai [74, 75]. Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nebuvo susijęs su atsaku į gydymą 5-fluorouracilu, tačiau tokie navikai buvo jautresni gydymui irinotekanu, palyginti su tais navikais, kuriuose mikrosatelitų nestabilumo nenustatyta [76–78].

Taigi, nustačius genų, dalyvaujančių storosios žarnos kancerogenezėje, mutacijas, praktiniu aspektu yra svarbi įvairių tyrėjų, tarp jų ir mūsų kolegų [68] išsakyta mintis, kad storosios žarnos vėžio „...ligos įvertinimas molekulinio lygmeniu yra svarbus žingsnis personalizuotos terapijos link“.

Kaip jau buvo minėta, mikrosatelitų nestabilumas naudojamas kaip atrankinės patikros žymuo paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio arba Lynčo sindromo atvejais. Šis sindromas paveldimas autosominiu dominantiniu būdu ir padidina riziką susirgti kai kuriomis onkologinėmis ligomis: esant šiam sindromui rizika susirgti storosios žarnos vėžiu padidėja nuo 20 iki 75 proc., gimdos kūno vėžiu – nuo 15 iki 70 proc. Kitų Lynčo sindromo spektro navikų – kiaušidžių, skrandžio, plonosios žarnos, kasos, tulžies lataukų, šlapimo takų, smegenų, odos – rizika yra mažesnė (< 15 proc.), palyginti su rizika bendrojoje populiacijoje (1 lent.) [25, 79].

1 lentelė. Rizika susirgti įvairių lokalizacijų navikais esant Lynčo sindromui (modifikuota pagal [79])

Navikai pagal lokalizaciją	Lynčo sindromas (proc.)	Bendroji populiacija (proc.)
Storosios žarnos - vyrams	54–74	5
Storosios žarnos - moterims	30–52	5
Gimdos kūno	28–60	2
Kiaušidžių	6–7	1
Skrandžio	6–9	<1
Plonosios žarnos	3–4	<1
Kasos	<1–4	1
Tulžies latakų	1	retai
Šlapimo takų	3–8	retai
Smegenų (glioblastomų)	2–3	<1
Odos*	1–9	retai

*Riebalinių liaukų adenomų ir keratoakantomų.

Svarbu pažymėti, kad moterims šis sindromas iki 40–60 proc. atvejų kliniškai anksčiau pasireiškia gimdos kūno vėžiu nei storosios žarnos vėžiu. Nors Lynčo sindromas sudaro tik 2–5 proc. visų storosios žarnos vėžio atvejų ir apie 2–4 proc. visų gimdos kūno vėžio atvejų [80, 81], tačiau šis sindromas yra svarbus ne vien todėl, kad Lynčo sindromo spektro navikai išsivysto jaunesnio amžiaus (40–60 metų) asmenims negu bendrojoje populiacijoje, bet ir todėl, kad iki 30 proc. atvejų pacientams gali išsivystyti sinchroniniai arba metachroniniai Lynčo sindromo spektro navikai.

Pirmą kartą Lynčo sindromas paminėtas 1913 metais, kai *A. S. Warthin* aprašė savo siuvėjo šeimos istoriją. Vėliau šį sindromą ir jo priežastis plačiai tyrinėjo *H. T. Lynch* ir todėl sindromas pavadintas minėto tyrėjo vardu (pagal

[82]). Pats *H. T. Lynch* 1985 metais pasiūlė šį sindromą vadinti paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio sindromu (HNPCC), pažymėdamas jo paveldimą pobūdį, padidėjusią riziką susirgti storosios žarnos vėžiu ir tai, kad šiam vėžiui nebūdinga žarnyno polipozė [83]. Šiuo metu rekomenduojami abu pavadinimai: tuos atvejus, kai nustatyta mutacija nors viename iš DNR pažeidimų taisymo sistemos genų, rekomenduojama vadinti Lynčo sindromu, o tuos atvejus, kurie, nors ir atitinka Bethesdos ar Amsterdamo kriterijus, bet mutacijų nenustatyta – HNPCC [84, 85].

Lynčo sindromas pasireiškia dėl genetinių pažeidimų (mutacijų) genuose, kurie dalyvauja klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažeidimų taisymo sistemoje. Šioje sistemoje identifikuoti keturi pagrindiniai baltymai: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, kuriuos koduoja minėti genai ir kuriems būdinga savita raiška [86]. Jeigu kuris nors iš keturių pagrindinių baltymų yra funkciškai neaktyvus, DNR pažeidimas neištaisomas, todėl atsiranda mikrosatelitų nestabilumas. Nustatyta, kad apie 90 proc. Lynčo sindromo navikų būdingas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas [87, 88].

Šiuo metu, siekiant diagnozuoti Lynčo sindromą, naudojami keli tyrimo metodai: mikrosatelitų nestabilumo tyrimas ir klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažeidimų taisymo sistemos baltymų imunohistocheminis tyrimas. Teigiami mikrosatelitų nestabilumo ar imunohistocheminių tyrimų rezultatai rodo, kad navike yra sutrikusi Lynčo sindromą sąlygojančių genų veikla ir tai padeda atrinkti pacientus, kuriems reikalingas molekulinis genetinis ištyrimas. Atlikus molekulinį genetinį ištyrimą dažniausiai nustatomos *MLH1* ir *MSH2* (iki 90 proc.) genų mutacijos [89]; *MSH6* geno mutacijos nustatomos iki 8 proc. storosios žarnos vėžio atveju, bet ženkliai dažniau – gimdos kūno vėžio atveju; *PMS2* ir kitų genų (*MSH3*, *PMS1*) mutacijos nustatomos retai [90, 91]. Svarbi ne tik tam tikro geno mutacija, bet ir jos pobūdis. Mažosios genų mutacijos, kurios įvyksta dėl vieno nukleotido pakaitos ir vieno ar kelių nukleotidų tarpų arba iškritų gali būti: beprasmės (angl. *nonsense*) mutacijos, keičiančios prasmę (angl. *missense*) mutacijos ir tyliosios (angl. *silence*) taškinės mutacijos. Dėl beprasmių mutacijų kodonas, pakeitus jame vieną nukleotidą,

tampa beprasmis, t. y. nekoduojantis jokios aminorūgšties. Toks baltymas dažniausiai jau nebegali atlikti savo funkcijos. Dėl keičiančių prasmę mutacijų pakitus nukleotidui, pasikeičia ir kodonas. Jis ima koduoti jau kitos rūšies aminorūgštį, todėl baltyme viena aminorūgštis pakeičiama kita. Pokyčio padariniai lemia naujo baltymo funkciją ir gali ją sutrikdyti. Tyliosios taškinės mutacijos taip pat yra nukleotidų pakaitos. Joms vykstant dažniausiai pakeičiamas trečiasis kodono nukleotidas, tačiau dėl to, kad genetinis kodas išsigimęs, koduojama aminorūgštis lieka nepakitusi ir baltymo funkcija išlieka. Beprasmės mutacijos paprastai sukelia neigiamą imunohistocheminę klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų dažymo reakciją, o tyliųjų taškinių mutacijų atveju šios sistemos baltymai dažniausiai dar išlieka imunoreaktyvūs, todėl imunohistocheminės reakcijos yra teigiamos (normalios). Beprasmės mutacijos sukelia mikrosatelitų nestabilumą, ir individai, turintys šias mutacijas, susijusias su Lynčo sindromo navikais, suserga būdami jauno amžiaus; individai, turintys keičiančias prasmę bei tyliąsias taškines mutacijas, suserga onkologinėmis ligomis, kurių klinikinė eiga dažnai nėra tipinė [86].

Toliau apžvelgsime Lynčo sindromo klinikinius aspektus. Sukurtos įvairios klinikinės rekomendacijos siekiant nustatyti pacientus, turinčius Lynčo sindromą. 1990 metais pirmą kartą pasiūlytos vieningos rekomendacijos – Amsterdamo I kriterijai, kurios leido gydytojams kliniškai įtarti šį sindromą [92]. Remiantis šiomis rekomendacijomis Lynčo sindromą galima įtarti, jeigu šeimos atitinka visus žemiau nurodytus kriterijus:

- mažiausiai trys giminaičiai sirgo storosios žarnos vėžiu;
- vienas iš sergančiųjų yra kitų dviejų pirmos eilės giminaitis;
- navikai diagnozuoti mažiausiai dvejose iš eilės einančiose kartose;
- bent vienas navikas diagnozuotas iki 50 metų amžiaus;
- navikai patvirtinti histologiškai ir atmesta šeiminei adenomatozinei polipozei.

Dėl minėtų rekomendacijų buvo diskutuojama, kadangi jose minimas tik storosios žarnos vėžys, o kiti Lynčo sindromo spektro navikai nepaminėti. Todėl 1999 metais buvo pasiūlyti Amsterdamo II kriterijai [93]. Remiantis šiais kriterijais Lynčo sindromą galima įtarti, jeigu šeimos atitinka visus toliau išvardytus kriterijus:

- mažiausiai 3 giminaičiai sirgo Lynčo sindromo spektro navikais: storosios žarnos, gimdos kūno, plonosios žarnos, šlapimtakių ar inkstų geldelių;

- vienas iš sergančiųjų turi būti kitų dviejų pirmos eilės giminaitis;
- minėti navikai diagnozuoti mažiausiai dvejose iš eilės einančiose kartose;
- bent vienas navikas diagnozuotas iki 50 metų amžiaus;
- navikai patvirtinti histologiškai ir atmesta šeiminei adenomatozinei polipozei esant storosios žarnos vėžiui.

Kadangi šias rekomendacijas ne visada galima pritaikyti klinikinėje praktikoje, nes pacientai dažnai negali pateikti išsamios informacijos apie savo šeimos narių ligas [94], todėl 1997 metais pasiūlytos Bethesdos rekomendacijos [95]. Šiose rekomendacijose didžiausias dėmesys skiriamas pacientams, sergantiems storosios žarnos vėžiu, tačiau nepakankamas dėmesys – pacientams, sergantiems kitų lokalizacijų Lynčo sindromo spektro navikais. Remiantis minėtomis rekomendacijomis, siūloma atlikti mikrosatelitų nestabilumo tyrimą tiems asmenims, kurie atitinka bent vieną iš nurodytų kriterijų:

- pacientas serga bet kokios lokalizacijos vėžiu ir jo šeima atitinka Amsterdamo kriterijus;

- serga dviem su Lynčo sindromu susijusiais navikais, tarp jų sinchroniniais/metachroniniais storosios žarnos ar kitais – gimdos kūno, kiaušidžių, skrandžio, tulžies latakų, plonosios žarnos ar šlapimo takų navikais;

- serga storosios žarnos vėžiu ir turi pirmos eilės giminaičių, sergančių storosios žarnos vėžiu ir/ar kitais su Lynčo sindromu susijusiais ne žarnyno

navikais ir/ar storosios žarnos adenomomis; vienas iš navikų turi būti diagnozuotas iki 45 metų, o adenoma – iki 40 metų amžiaus;

- serga storosios žarnos vėžiu ar gimdos kūno vėžiu, diagnozuotu iki 45 metų amžiaus;

- serga dešinėsios pusės storosios žarnos vėžiu, kai histologiškai nustatyta nediferencijuota vėžio forma (solidinė/kribriforminė) arba žiedinių ląstelių karcinoma (daugiau 50 proc. žiedinių ląstelių) ir kai vėžys diagnozuotas iki 45 metų amžiaus;

- serga storosios žarnos adenomomis, diagnozuotomis iki 40 metų amžiaus.

Bethesdos rekomendacijos buvo peržiūrėtos 2004 metais ir supaprastintos siekiant jas įdiegti į kasdienę klinikinę praktiką. Naujosios rekomendacijos remiasi ne tik šeimine anamneze, bet ir paciento amžiumi diagnozės nustatymo metu, Lynčo sindromo spektro navikų skaičiumi ir kai kuriais navikų histologiniais ypatumais (storosios žarnos vėžio atveju) [96]. Pagal peržiūrėtas Bethesdos rekomendacijas mikrosatelitų nestabilumo tyrimą siūloma atlikti tiems asmenims, kurie atitinka bent vieną iš nurodytų kriterijų:

- tam pačiam pacientui diagnozuoti keli sinchroniniai/metachroniniai storosios žarnos navikai ar kiti Lynčo sindromo spektro navikai: gimdos kūno, kiaušidžių, skrandžio, tulžies latakų, plonosios žarnos, inkstų geldelių ar šlapimtakių, smegenų ir odos (riebalinių liaukų adenomos ir keratoakantomos), nepriklausomai nuo amžiaus;

- storosios žarnos vėžys diagnozuotas iki 60 metų amžiaus (imtinais) ir jam būdingi histologiniai mikrosatelitų nestabilumo požymiai: ryški naviko infiltracija limfocitais, *Crohns-like* limfocitinė reakcija, naviko mucininė/žiedinių ląstelių diferenciacija;

- pacientas serga storosios žarnos vėžiu ir turi pirmos eilės giminaičių sergančių Lynčo sindromo navikais, iš kurių bent vienas diagnozuotas iki 50 metų amžiaus;

- pacientas serga storosios žarnos vėžiu ir turi du ar daugiau pirmos/antros eilės giminaičių, kuriems buvo diagnozuoti Lynčo sindromo navikai (bet kokiam amžiuje).

Šiuo metu, diagnozuojant pacientams Lynčo sindromą, dažniausiai remiamasi naujausiomis Bethesdos rekomendacijomis (2004 m.) ir mikrosatelitų nestabilumo diagnostiniais tyrimais. Šio derinio jautrumas, literatūros duomenimis, siekia nuo 72 iki 100 proc., o specifiškumas svyruoja nuo 77 iki 98 proc. [97]. Reikia pažymėti, kad šie kriterijai labiausiai pritaikyti pacientams, sergantiems storosios žarnos vėžiu, o ne gimdos kūno vėžiu.

Gimdos kūno vėžio atveju įvairios institucijos siūlo skirtingas rekomendacijas ir algoritmus kokioje amžiaus grupėje, kada ir kuriuos mikrosatelitų nestabilumo diagnostinius tyrimus reikėtų atlikti norint identifikuoti Lynčo sindromą tarp sergančiųjų gimdos kūno vėžiu, tačiau vieningų rekomendacijų dar nėra. Tokias rekomendacijas siūlo:

- Ginekologų onkologų draugija (SGO; angl. *Society of Gynecologic Oncology*) rekomenduoja gydytojui genetikui konsultuoti nukreipti tas moteris, kurių didesnė negu 20–25 proc. rizika turėti Lynčo sindromą. Rizika vertinama remiantis šeimine anamneze (Amsterdamo II kriterijais) ir sinchroniniais/metachroniniais gimdos kūno ar storosios žarnos navikais, diagnozuotais iki 50 metų amžiaus [98];

- Nyderlandų valstybinis vėžio centras savo rekomendacijose siūlo gydytojui genetikui konsultuoti nukreipti tas moteris, kurioms gimdos kūno vėžys diagnozuotas iki 50 metų amžiaus ir mikrosatelitų nestabilumui nustatyti naudoti abu, t.y. mikrosatelitų nestabilumo ir imunohistocheminiai tyrimo metodai [99];

- Europos ekspertų *Mallorca group* rekomenduoja visoms moterims, kurioms gimdos kūno vėžys diagnozuotas iki 70 metų amžiaus, atlikti navikų mikrosatelitų nestabilumo ir/ar imunohistocheminius tyrimus [100].

Taigi, įdiegus vieningas rekomendacijas, galima būtų anksčiau diagnozuoti Lynčo sindromą pacientėms, sergančioms gimdos kūno vėžiu, ir pasiūlyti joms ir jų šeimos nariams atitinkamus tyrimus ir adekvačią stebėseną.

Atsižvelgiant į tai, kad, esant Lynčo sindromui, gimdos kūno vėžys yra antrasis pagal dažnumą po storosios žarnos vėžio, o duomenų apie mikrosatelitų nestabilumą nėra daug, todėl tyrimo objektu ir pasirinktas gimdos kūno vėžys.

2.4. Gimdos kūno vėžio paplitimas ir rizikos veiksniai

Pasaulyje gimdos kūno vėžys užima septintąją vietą tarp visų piktybinių navikų ir yra labiausiai paplitęs moterų lyties organų navikas [1, 101]. 2008 metais šis navikas diagnozuotas 290 000 moterų, o sergamumo ir mirtingumo rodikliai atitinkamai buvo 12,9/100 000 ir 2,4/100 000 moterų [2]. Gimdos kūno vėžys labiausiai paplitęs ekonomiškai stipriose Europos ir Šiaurės Amerikos šalyse: jose sergamumas apie 10 kartų didesnis, palyginti su sergamumu ekonomiškai silpnose šalyse [2, 102]. Centrinėje ir Rytų Europoje sergamumo ir mirtingumo rodikliai yra atitinkamai 15,6/100 000 ir 3,4/100 000 moterų [3]. Remiantis *EUROCARE* duomenimis, penkerių metų išgyvenamumas Europoje siekia 75 proc. [4]. Gimdos kūno vėžys yra labiausiai paplitęs moterų lyties organų piktybinis navikas ir Lietuvoje. Reikia pažymėti, kad sergamumas didėja: 2006 metais buvo diagnozuoti 539 atvejai, o 2010 metais – 624 atvejai; sergamumo ir mirtingumo rodikliai buvo atitinkamai 18,8/100 000 ir 3,4/100 000 moterų [5].

Tikslios gimdos kūno vėžio priežastys nėra aiškios, tačiau nustatyti veiksniai, galintys turėti įtakos šiai ligai atsirasti.

Pagrindiniai gimdos kūno vėžio rizikos veiksniai pateikti 2-oje lentelėje. Toliau juos apžvelgsime detaliau.

Vienas pagrindinių/svarbiausių gimdos kūno vėžio rizikos veiksnių yra moterų amžius – didėjant amžiui didėja ir gimdos kūno vėžio rizika [102].

2 lentelė. Rizikos veiksniai, susiję su gimdos kūno vėžiu

Veiksniai, didinantys riziką	Veiksniai, mažinantys riziką
Vyresnis amžius	Dauginiai gimdymai
Estrogenų vartojimas	Peroralinių kontraceptikų vartojimas
Tamoksifeno vartojimas	Fizinis aktyvumas
Menstruaciniai veiksniai	Mitybiniai veiksniai
Nėštumų nebuvimas, nevaisingumas	Rūkymas (įrodymų dar nepakanka)
Antsvoris ir nutukimas	
Diabetas	
Lynčo sindromas	
Šeiminė anamnezė (gimdos kūno, kiaušidžių, krūties ar storosios žarnos vėžys)	

Egzogeninis estrogenų, kaip gimdos kūno rizikos veiksnio poveikis, siejamas su estrogenų terapija pomenopauzės laikotarpiu bei su tamoksifeno vartojimu, o endogeninį poveikį gali sąlygoti nutukimas, neovuliaciniai menstruaciniai ciklai arba estrogenus produkuojantys navikai. Estrogenų terapija (be progestino) ženkliai padidina endometriumo hiperplazijos ar karcinomos riziką: atvejo-kontrolės bei perspektyvinių tyrimų duomenimis, reliatyvioji rizika susirgti yra 1,1–15,0 kartų didesnė, palyginti su moterų, kurioms ši terapija netaikyta [103, 104]. Rizika priklauso tiek nuo estrogenų dozės, tiek nuo jų vartojimo trukmės. Pažymėtina, kad sudėtinė estrogenų ir progestinų hormonoterapija endometriumo hiperplazijai ar vėžio rizikai įtakos neturi [105].

Moterų, pomenopauzės laikotarpiu vartojančių tamoksifeną, rizika susirgti gimdos kūno vėžiu didesnė, palyginti su rizika tų moterų, kurios minėto preparato nevartoja [106, 107]. Ši rizika priklauso nuo kumuliacinės vaisto dozės ir vartojimo trukmės. Kita vertus, nenustatyta, kad moterų,

kurioms yra premenopauzė, dėl tamoksifeno vartojimo gimdos kūno vėžio rizika didėja [107].

Nutukimas nustatomas 17–46 proc. sergančiųjų gimdos kūno vėžiu [108]. Daugelio tyrėjų duomenimis, tokioms moterims rizika susirgti šiuo piktybiniu naviku 4–5 kartus, o turinčioms antsvorio – 2 kartus didesnė, palyginti su normalaus svorio moterų rizika [109, 110]. Taip, matyt, yra todėl, kad nutukusių moterų endogeninių estrogenų kiekis yra padidėjęs dėl androstendiono virtimo į estroną ir androgenų aromatizacijos į estradiolį; abu šie junginiai nustatomi periferiniame adipoziniame audinyje.

Reikia pažymėti, kad gimdos kūno vėžio rizika didesnė ir tarp sergančiųjų diabetu [111, 112].

Ankstyva menarchė bei vėlyva menopauzė taip pat susijusios su gimdos kūno vėžio rizika [113]. Šie abu veiksniai sąlygoja ilgesnę estrogenų poveikio organizmui trukmę. Moterų, kurioms nustatytas Lynčo sindromas, padidėjusi rizika susirgti ne tik storosios žarnos, bet ir gimdos kūno, kiaušidžių ir kitais piktybiniais navikais [98, 114].

Didesnę riziką susirgti gimdos kūno vėžiu sąlygoja ir kitų piktybinių navikų – gimdos kūno, kiaušidžių, krūties ar storosios žarnos atveju buvimas šeiminėje anamnezėje [115, 116].

Reikia taip pat pažymėti, kad kai kurie veiksniai gali mažinti gimdos kūno vėžio riziką. Įvairių tyrimų duomenimis, didesnis gimdymų skaičius bei vyresnis amžius gimdymo metu mažina gimdos kūno piktybinių navikų riziką moterims, kurioms yra pomenopauzė [117, 118]. Tai siejama su progesterono apsauginiu vaidmeniu bei estradiolo stimuliaciniu poveikiu šios su hormonais susijusios ligos atveju.

Peroralinių kontraceptikų (estrogenų ir progestinų derinio) vartojimas mažina gimdos kūno vėžio riziką [119, 120]. Jų apsauginis poveikis persistuoja 10–20 metų net ir nutraukus kontraceptikų vartojimą. Manoma, kad šių preparatų nauda susijusi su jų komponentu progestinu, kuris slopina endometriumo proliferaciją [120].

Nors nutukimas yra gerai ištyrinėtas gimdos kūno vėžio rizikos veiksnys, tačiau mitybos veiksnių vaidmuo nėra aiškus: vienuose tyrimuose (atvejo-kontrolės) nustatyta galima sąsaja tarp vaisių ir daržovių (daugelyje yra fitoestrogenų) vartojimo ir mažesnės šio vėžio rizikos [121], kituose (perspektyviniuose) tokios sąsajos nekonstatuota [122, 123].

Kai kurių autorių duomenimis, gimdos kūno vėžio riziką gali mažinti fizinis aktyvumas. Šio veiksnio reikšmė daugiau siejama su gyvenimo būdu, padedančiu išvengti nutukimo ar antsvorio, kurie yra žinomi šios lokalizacijos vėžio rizikos veiksniai [124, 125].

Epidemiologinių tyrimų duomenys apie sąsają tarp rūkymo ir gimdos kūno vėžio yra nevienareikšmiai: vienuose perspektyviniuose tyrimuose nustatyta, kad rūkančių moterų rizika premenopauzės laikotarpiu didėja, kituose – tokia rizika mažėja, ypač pomenopauzės laikotarpiu, palyginti su nerūkančių moterų rizika [126, 127]. Rūkymo poveikio gimdos kūno vėžio rizikai biologinis mechanizmas nėra aiškus, tačiau gali būti, kad jis susijęs su pokyčiais endogeniniuose hormonuose ar jų metabolituose. Kita vertus, žinant, kad rūkymas turi neigiamos įtakos sveikatai įvairiais aspektais, jo poveikis moterims, kurioms yra pomenopauzė, neturėtų būti sureikšmintas.

Prognozuojama, kad artimiausiu metu sergamumo gimdos kūno vėžiu rodikliai tarp moterų, kurioms yra pomenopauzė, daugumoje Europos šalių nemažės [102]. Atsižvelgiant į tai, kad vėžio kontrolės pagrindinis tikslas – sumažinti mirtingumą nuo vėžio, o tai pasiekti galima ne tik mažinant sergamumą, bet ir gerinant, remiantis naujausiais molekulinės onkologijos, genetikos, nanomedicinos ir kitų mokslų pasiekimais, diagnostiką ir gydymą, todėl svarbūs įvairių lokalizacijų, tarp jų ir gimdos kūno vėžio, molekuliniai-genetiniai tyrimai.

2.5. Gimdos kūno vėžio kancerogenezė

1983 metais *J. V. Bokhman* [128] remdamasis klinikiniais stebėjimais ir klinikinėmis-patologinėmis koreliacijomis, pirmasis pasiūlė endometriumo

kancerogenezės modelį. Taigi, atsižvelgiant į naviko histologinį tipą, biologinius ypatumus bei klinikinę ligos eigą, skiriami du gimdos kūno vėžio tipai. Dauguma gimdos kūno navikų – apie 70–80 proc. – apibūdinami kaip endometrioidinio arba I tipo karcinomos. Šie navikai išsivysto atipinės hiperplazijos fone, yra gerai diferencijuoti, priklausomi nuo hormoninės organizmo būklės, kliniškai jų ligos prognozė yra geresnė, palyginti su II tipo navikais. Pacienčių 5-erių metų išgyvenamumas, sergant I stadijos I tipo karcinoma, yra apie 90 proc. [129]. Dauguma šio tipo navikų (90 proc.) yra sporadiniai, o likę 10 proc. – paveldimi, susiję su Lynčo sindromu.

II tipo navikai arba neendometrioidinė karcinoma (dažniausiai serozinė papilinė karcinoma), pasitaiko rečiau (apie 10–20 proc. atvejų). Šie navikai išsivysto iš atrofino endometriumo vyresnio amžiaus moterims, yra blogai diferencijuoti, pasižymi agresyvia klinicine eiga, greičiau metastazuoja ir lemia blogesnę ligos prognozė. Bendrasis moterų išgyvenamumas sergant šio tipo navikais yra apie 30 proc. [130]. II tipo endometriumo navikai nėra susiję su hormonine organizmo būkle ir Lynčo sindromu.

Klinikinės-patologinės I ir II tipo gimdos kūno vėžio charakteristikos apibendrintos 3-oje lentelėje.

3 lentelė. I ir II tipo gimdos kūno vėžio klinikinės-patologinės charakteristikos

Charakteristikos	I tipas	II tipas
Amžius	pre- ir perimenopauzės	pomenopauzės
Endokrininiai – metaboliniai sutrikimai	yra	nėra
Sąsajos su estrogenais	yra	nėra
Endometriumo gleivinė	hiperplazija	atrofija
Naviko histologinis tipas	endometrioidinis	serozinis, šviesiųjų ląstelių
Naviko diferenciacijos laipsnis	gerai diferencijuotas	blogai diferencijuotas
Naviko invazijos į	paviršinis	gilus

Charakteristikos	I tipas	II tipas
miometriumą gylis		
Ligos eiga	pastovi	progresuojanti/agresyvi

Praėjus maždaug dešimtmečiui po *J. V. Bokhman* pasiūlytos klasifikacijos šis dualistinis gimdos kūno vėžio modelis vėliau buvo papildytas remiantis molekulinėmis tyrimų rezultatais [131]. Jus trumpai apžvelgsime toliau.

Ir endometrioidinė, ir serozinė karcinomos, t.y. I ir II tipo endometriumo karcinomos, pasižymi genetiniu nestabilumu ir savitais genetiniais bei molekuliniais pokyčiais [132].

I tipo karcinomoje pagrindiniai genetiniai pokyčiai, kurie dalyvauja kancerogenezėje, yra mutacijos *PTEN* genuose ir/ar defektai DNR pažaidų taisymo sistemos genuose, mutacijos *KRAS* protoonkogene bei pokyčiai *beta* katenino gene (4 lent.) (pagal [133]).

4 lentelė. Genetinių pokyčių dažnumas esant endometrioidinei (I tipo) karcinomai

Genetiniai pokyčiai	Dažnumas, proc.
<i>PTEN</i> slopinimas	30–60
Mikrosatelitų nestabilumas	20–30
<i>Beta</i> katenino mutacija	28–35
<i>KRAS</i> mutacija	10–30
<i>PIK3CA</i> mutacija	25

PTEN – naviką slopinantis genas; *KRAS* – protoonkogenas; *PIK3CA* protoonkogenas.

II tipo endometriumo navikuose dažniausiai nustatomos *p53* mutacijos (paprastai jos yra nediploidinės) bei padidėjusi *HER2/neu* onkogeno raiška, o

mikrosatelitų nestabilumas nėra dažnas [133]. Genetinių pokyčių dažnumas esant neendometrioidinei karcinomai pateiktas 5-oje lentelėje.

5 lentelė. Genetinių pokyčių dažnumas esant neendometrioidinei (II tipo) karcinomai

Genetiniai pokyčiai	Dažnumas, proc.
<i>p53</i> mutacija	90
E-kadherino slopinimas	80–90
Ciklinų D1 ir E amplifikacija	26–42
<i>p16</i> slopinimas	40
<i>c-erb B2</i> amplifikacija	26
<i>PTEN</i> mutacija	10
<i>PIK3CA</i> mutacija	5
<i>KRAS</i> mutacija	0–5
Mikrosatelitų nestabilumas	0–5

p53 – naviką slopinančio baltymo p53 genas; *p16* – nuo ciklinų priklausomų kinazių slopiklio baltymo p16 genas; *c-erbB2* – augimo veiksnio receptoriaus genas; *PTEN* – naviką slopinantis genas; *PIK3CA* – protoonkogenas; *KRAS* – protoonkogenas.

Gimdos kūno etiopatogenezėje svarbių genetinių ir epigenetinių mechanizmų išsamūs tyrimai leidžia geriau suprasti gimdos kūno vėžio atsiradimo priežastis. Nustačius genų, svarbių ligos iniciacijai ir progresijai, mutacijas, galima prognozuoti ligos eigą, parinkti gydymą bei vertinti atsaką į gydymą [134, 135].

2.6. Mikrosatelitų nestabilumas ir gimdos kūno vėžio molekulinė ypatumų praktiniai aspektai

Mikrosatelitų nestabilumas nustatomas nuo 20 iki 30 proc. sporadinių gimdos kūno vėžio atvejų [12, 86]. Siekiant nustatyti mikrosatelitų pokyčių įtaką esant gimdos kūno vėžiui, tyrimai atliekami keliomis kryptimis:

aiškinamasi, ar mikrosatelitų nestabilumas priklauso nuo pacienčių amžiaus, naviko histologinio tipo, diferenciacijos laipsnio, invazijos į miometriumą gylio, metastazavimo į limfinius mazgus bei pacienčių išgyvenamumo.

Palygintas mikrosatelitų nestabilumo dažnis tarp endometrioidinio ir neendometrioidinio tipo adenokarcinomų sporadinio gimdos kūno vėžio atveju [136]. Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas statistiškai reikšmingai dažniau endometrioidinio tipo adenokarcinomose, palyginti su neendometrioidinio tipo adenokarcinomomis (atitinkamai 20 ir 0 proc.). Konstatuota sąsaja tarp mikrosatelitų nestabilumo ir naviko diferenciacijos laipsnio (atitinkamai 12 ir 21 proc. esant G1 bei G2 laipsnio diferenciacijai ir 50 proc. esant G3 laipsnio diferenciacijai). Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas susijęs su naviko invazija į limfinius mazgus ir miometriumą, taip pat su ligos stadija [12]. Svarbu pažymėti tai, kad nustatyta koreliacija tarp mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo ir didesnio ciklino A ir skp2 (ląstelių dalijimąsi reguliuojantys baltymai) imunoreaktyvumo; šie pokyčiai yra ligos blogos prognozės biologiniai žymenys. Todėl manoma, kad mikrosatelitų nestabilumas gali rodyti blogesnę prognozę sergant endometrioidinio tipo gimdos kūno adenokarcinoma [12].

Tyrinėta mikrosatelitų nestabilumo sąsaja su gimdos kūno vėžio histologiniais tipais. Italijos mokslininkai *M. G. Tibiletti* ir bendraautoriai [137] konstatavo, kad mikrosatelitų nestabilumas turi įtakos ankstyvajai gimdos kūno kancerogenezei formuojantis endometrioidinio tipo adenokarcinomai. Būtent mikrosatelitų nestabilumo dažnis 6q chromosomos vietoje rodo, kad ši vieta, matyt, yra itin svarbi gimdos kūno kancerogenezeje. Pažymėtina, kad minėti autoriai, kitaip nei *H. J. An* ir bendraautoriai [12], nerado sąsajos tarp mikrosatelitų nestabilumo ir naviko diferenciacijos laipsnio, ligos stadijos bei kitų klinikinių-patologinių charakteristikų. Kitų autorių duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas tiesiogiai koreliuoja su naviko diferenciacijos laipsniu, yra susijęs su

endometro atrofija, plokščialąsteline metaplazija, invazijos gyliu į raumenis, naviko išplitimu už gimdos ribų ir kt. [138].

Mikrosatelitų nestabilumas yra nepriklausomas prognozinis žymuo sergant storosios žarnos vėžiu [72, 73], todėl daroma prielaida, kad mikrosatelitų nestabilumas gali turėti įtakos sergančiųjų gimdos kūno vėžiu išgyvenamumui. Tačiau dėl mikrosatelitų nestabilumo kaip prognozinio žymens endometrioidinės adenokarcinomos atveju duomenys negausūs ir prieštaringi. Kai kurie tyrimai parodė, kad mikrosatelitų nestabilumas susijęs su geresne ligos prognoze [139], tačiau kituose tyrimuose gauti priešingi rezultatai, t. y. mikrosatelitų nestabilumas buvo susijęs su blogesne ligos prognoze [140, 141]. Taip pat yra duomenų, kad mikrosatelitų nestabilumas neturi prognozinės reikšmės [142].

Atsižvelgiant į tai, kad šeiminis nepolipozinis storosios žarnos vėžys yra paveldimas sindromas, kuris rodo padidėjusią riziką susirgti žarnyno, gimdos kūno, kiaušidžių ir kitų lokalizacijų vėžiu, siekiama nustatyti, koks mikrosatelitų nestabilumo dažnis, kai vienu metu yra keli navikai. *M. Planck* ir bendraautorai [143] į tyrimą įtraukė moteris, kurioms 1958–1998 metų laikotarpiu diagnozuota gimdos kūno ir storosios žarnos navikai (n=256); daliai moterų pirmasis navikas (gimdos kūno arba storosios žarnos) diagnozuotas iki 50 metų amžiaus, o kitai daliai – iš karto diagnozuoti abu navikai. Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas 75 proc. navikų. Atsižvelgiant į tai, kad, mikrosatelitų nestabilumas, esant sporadiniam gimdos kūno vėžiui, gali siekti daugiau nei 30 proc., o esant sporadiniam kiaušidžių vėžiui – 17 proc., buvo iškelta hipotezė, kad sergant abiejų lokalizacijų navikais mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas turėtų būti dažnesnis, palyginti su mikrosatelitų nestabilumo dažniu sergant vienu iš tų navikų [144]. Panaudojus penkis standartinius (rekomenduojamus Nacionalinio vėžio instituto, JAV) mikrosatelitų žymenis, sąsajos tarp mikrosatelitų nestabilumo sergant abiejų lokalizacijų navikais – kiaušidžių ir gimdos kūno vėžiu – nenustatyta (n=45). Pacientėms nenustatyta mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo nei sergant kiaušidžių, nei sergant

gimdos kūno vėžiu, tačiau mikrosatelitų mažo dažnio nestabilumas konstatuotas abiem atvejais [144].

Viena vertus, molekulinį pokyčių vertinimas sergant gimdos kūno vėžiu vis dar yra tyrinėjimų stadijos, kita vertus, kai kurie aspektai gali turėti praktinės naudos tiek šiandien, tiek ir artimiausioje ateityje. Šie aspektai aptariami toliau.

Šiuo metu pripažįstama, kad ir imunohistocheminiai klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos genų (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ar *PMS2*) tyrimai, ir mikrosatelitų nestabilumo molekulinė analizė turi akivaizdžią naudą nustatant Lynčo sindromą pacientėms, sergančioms gimdos kūno vėžiu, ypač toms, kurioms ši liga išsivystė esant jaunesnio amžiaus, premenopauzės laikotarpiu, taip pat toms, kurios serga storosios žarnos ar kitais Lynčo sindromo navikais, ar turi šiam sindromui būdingą šeiminingą anamnezę.

Svarbūs molekuliniai tyrimai vertinant ir ikivėžinius gimdos kūno pokyčius. *MLH1* tyrimas yra naudingas siekiant įvertinti endometriumo atipinę kompleksinę hiperplaziją, kurią kartu dažnai lydi adenokarcinoma [145]. Jaunoms premenopauzę išgyvenančioms moterims, kurioms, atlikus endometriumo biopsiją, diagnozuota atipinė kompleksinė hiperplazija ir nustatyta neigiama *MLH1* baltymo reakcija, netiesiogiai galima įtarti gimdos kūno vėžį [146].

Yra duomenų, kad mikrosatelitų nestabilumas arba mutacijos *PTEN* ir *CTNNB-1* (*beta* kateninas) gali reikšti palankesnę prognozę sergant gimdos kūno vėžiu, o *p53* ir *PIK3CA* mutacijos – agresyvesnę ligos eigą [146].

Nors taikinių terapijos indikacijos gimdos kūno vėžio atveju vis dar tyrinėjamos, tačiau artimiausioje ateityje, kaupiantis vis daugiau duomenų apie molekulinis pokyčius šiuose navikuose (ypač plačiai išplitusiuose ir recidyvavusiuose), tikslinga bus tuos duomenis panaudoti siekiant parinkti adekvačią gydymo ir stebėsenos taktiką.

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

3.1. Tiriamieji ir jų charakteristikos

Į stebėsenos perspektyvinį tyrimą įtrauktos 109 pacientės, kurioms Vilniaus universiteto Onkologijos institute (dabar Nacionalinis vėžio institutas) 2010–2011 metų laikotarpiu nustatytas gimdos kūno vėžys. Tiriamųjų imties dydis apskaičiuotas atsižvelgiant į tai, kad tyrimo laikotarpiu Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Konsultacinėje poliklinikoje turėtų apsilankyti apie 150 sergančiųjų gimdos kūno vėžiu. Numatant, kad mikrosatelitų nestabilumo paplitimas yra apie 40 proc., pakankamas tiriamųjų imties dydis – 107 atvejai esant reikšmingumo lygmeniui – 0,05. Prieš pradedant tyrimą iš Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto buvo gautas leidimas (protokolo Nr. 158200-05-180-43) tyrimui atlikti (1 priedas).

Moterys įtrauktos į tyrimą pagal šiuos kriterijus:

- gyvena Lietuvoje ir yra vyresnės nei 18 metų amžiaus;
- pasirašiusios *Asmens informavimo* bei *Informuoto asmens sutikimo* dalyvauti tyrime formas (3 ir 4 priedai);
- joms diagnozuotas gimdos kūno vėžys (pirminės pacientės).

Į tyrimą negalėjo būti įtrauktos moterys:

- jaunesnės nei 18 metų amžiaus;
- sergančios kitos lokalizacijos piktybiniais navikais;
- sergančios psichikos ligomis, genetinėmis ar nervų-raumenų sistemos ligomis;
- nėščiosios ir maitinančios krūtimi;
- atsisakiusios dalyvauti tolesniame tyrime ar negalinčios atlikti visų tyrimo procedūrų dėl kitų priežasčių.

Į tyrimą įtrauktų pacienčių amžiaus vidurkis buvo 64±10 metų (nuo 40 iki 83 m.). Didžiausią tiriamųjų dalį sudarė 60–69 metų amžiaus pacienčių grupė – 32,11 proc. (n=35); 50–59 metų ir 70–79 metų amžiaus grupės sudarė po –

27,52 proc. (n=30); 80–89 metų amžiaus grupė – 7,34 proc. (n=8). Mažiausią tiriamųjų dalį sudarė 40–49 metų amžiaus pacientės – 5,50 proc. (n=6).

Dauguma pacienčių – 93,58 proc. (n=102) buvo pomenopauzės būklės ir tik 6,42 proc. (n=7) – premenopauzės. 7 premenopauzės laikotarpio pacientės buvo nuo 40 iki 50 metų amžiaus.

Tirtų pacienčių kūno masės indekso (KMI) vidurkis buvo $31,1 \pm 5,6 \text{ kg/m}^2$ (nuo 19,4 iki 46,1). Didžiausią tiriamųjų dalį – 54,13 proc. (n=59) sudarė nutukusios moterys, kurių KMI buvo 30,0 ir daugiau; 35,78 proc. (n=39) sudarė moterys, kurios turėjo antsvorio, jų KMI buvo 25,0–29,9 ir tik 10,09 proc. (n=11) tiriamųjų turėjo normalų kūno svorį, t. y. jų KMI buvo 18,5–24,9. Tyrime nebuvo nė vienos pacientės, kurios kūno svoris būtų nepakankamas ($\text{KMI} < 18,5$).

Visoms tyrime dalyvaujančioms moterims (n=109) buvo atliktas chirurginis gydymas – gimdos pašalinimas (histerektomija) kartu šalinant gimdos priedus ir atliekant dubens ir paraaortinę limfadenektomiją pagal indikacijas. Operacinė biopsinė medžiaga iširta ir įvertinta UAB „Patologijos diagnostika“. Ligos stadija nustatyta pagal Tarptautinės ginekologijos ir akušerijos federacijos (FIGO; angl. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (2009 m.) standartus ir pagal piktybinių navikų išplitimo įvertinimo (TNM; angl. *Tumor, Nodes, Metastasis*) klasifikaciją (2010 m.). Mūsų tyrime endometrioidinio tipo adenokarcinoma nustatyta 91,74 proc. atvejų (100/109) ir tik 8,26 proc. (9/109 atvejų) – neendometrioidinio tipo adenokarcinoma.

Priklausomai nuo ligos stadijos ir naviko diferenciacijos laipsnio, daliai pacienčių (n=37) pagal patvirtintus Vilniaus universiteto Onkologijos instituto gydymo standartus buvo taikytas pooperacinis adjuvantinis spindulinis gydymas: vienoms – vagininė brachiterapija (n=21), kitoms – suderinta spindulinė terapija, t.y. išorinė spindulinė terapija derinama su vaginine brachiterapija (n=16). Išorinis dubens spindulinis gydymas realizuotas linijiniais greitintuvais: 15 MeV energija, vienkartinė dozė (VD) – 1,8–2 Gy, skirtos 23–28 frakcijos penkias dienas per savaitę, suminė dozė (SD) – 46–50

Gy. Vagininė (intraertminė) brachiterapija taikyta vieną kartą per savaitę: 3 procedūros, derinant su išorine spinduline terapija, ir 4 procedūros, skiriant tik brachiterapiją. Kiekvienos procedūros metu realizuota po 5 Gy (VD) į makšties gleivinę 0,5 cm gylyje, viršutinių makšties 2/3 ilgyje, naudojant didelių dozės galių iridžio-192 šaltinį, SD – 15–20 Gy. Tik 4 pacientėms, kurioms diagnozuotas regioninis ligos išplitimas (IVB FIGO ligos stadija), buvo taikyta pooperacinė chemoterapija derinant doksorubiciną – 60 mg/m² į veną ir cisplatiną – 50–60 mg/m² į veną kas tris savaites.

3.2. Tyrimo metodai

3.2.1. Anketinė apklausa

Ar buvo paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio (arba Lynčo sindromo) atvejų šeiminėje anamnezėje tiriamosios moterys buvo apklaustos pagal Amsterdamo II kriterijų klausimyną [93]. Tiriamųjų apklausa buvo atliekama tiesiogiai, tyrėjui apklausos rezultatus fiksuojant anketoje (4 priedas).

Kaip jau buvo minėta anksčiau, vadovaujantis klausimynu, tiriamųjų šeimos turėjo atitikti visus šiuos kriterijus:

- mažiausiai 3 giminaičiai sirgo Lynčo sindromo spektro navikais: storosios žarnos, gimdos kūno, plonosios žarnos, šlapimtakių ar inkstų geldelių; vienas iš sergančiųjų turėjo būti kitų dviejų pirmos eilės giminaitis;
- minėti navikai diagnozuoti mažiausiai dvejose iš eilės einančiose kartose;
- bent vienas navikas diagnozuotas iki 50 metų amžiaus;
- navikai patvirtinti histologiškai ir atmesta šeiminė adenomatozinė polipozė esant storosios žarnos vėžiui.

3.2.2. Antropometriniai matavimai

Visoms tiriamosioms buvo matuojamas ūgis ir kūno svoris. Apskaičiuotas KMI – kūno masę (kg) dalijant iš ūgio, pakelto kvadratu (m²). Remiantis Pasaulinės sveikatos organizacijos rekomendacijomis, tiriamosios

yra normalios kūno masės, jeigu jų KMI tarp 18,5 ir 24,9 kg/m²; turinčios antsvorio, jeigu KMI yra nuo 25,0 iki 29,9 kg/m²; nutukusios, jeigu KMI yra 30 kg/m² ir daugiau.

3.2.3. DNR gryninimas iš navikinio audinio

Iš parafine fiksuotų naviko audinio pavyzdžių (4–5 µm storio pjūviai) DNR buvo gryninama naudojant *MagneSil[®] Genomic, Fixed Tissue System* rinkinį (*Promega Corporation, JAV*) arba organinės ekstrakcijos metodu (pagal *Cancer Genetics Study Section, National Institute of Health, JAV* rekomendacijas) [147].

DNR gryninimas iš parafine fiksuoto naviko audinio *MagneSil[®] Genomic, Fixed Tissue System* rinkiniu buvo atliekamas pagal gamintojo protokolą. DNR nusodinta etanolio tirpalu, išdžiovinta ir saugoma kambario temperatūroje.

DNR gryninant organinės ekstrakcijos metodu, parafinas, kuriame fiksuotas naviko audinys, buvo tirpinamas ksilenu, nuosėdos kelis kartus plautos 70–96 proc. etanolio tirpalu. Išdžiovintos nuosėdos tirpintos 1 M natrio tiocianato (NaSCN) tirpale 10–15 val. 37°C temperatūroje, nusodintos centrifuguojant. Gautos nuosėdos buvo tirpinamos buferiniame tirpale (5 M NaCl, 0,5 M etilendiamintetraacetato (EDTA), Tween-20), pridedant fermento RNazės (20 mg/ml) ir inkubuotos 1 val. 37°C temperatūroje. Vėliau buvo pridedama fermento proteinazės K (10 mg/ml) ir inkubuojama 10–15 val. 55°C temperatūroje. DNR valymas atliktas fenolio ir chloroformo tirpalų mišiniu, nusodinimas – etanolio tirpalu. DNR buvo išdžiovinta ir saugoma kambario temperatūroje.

3.2.4. DNR gryninimas iš kraujo

Pacienčių kraujas (sveikas audinys) buvo imamas į 2–5 ml vakuuminį mėgintuvėlį su antikoaguliantu EDTA ir saugotas 4°C temperatūroje 2 val. arba ilgesnį laiką užšaldytas –20°C temperatūroje. DNR buvo gryninama naudojant

rinkinį *QIAamp Blood Midi Kit* (*Qiagen*, Vokietija) arba organinės ekstrakcijos metodu pagal Vilniaus universiteto Onkologijos institute patvirtintą metodiką.

DNR gryninimas iš periferinio kraujo leukocitų naudojant *QIAamp Blood Midi Kit* rinkinį buvo atliekamas pagal gamintojo protokolą. DNR buvo nusodinama etanolio tirpalu, išdžiovinama ir saugoma kambario temperatūroje.

Gryninant DNR organinės ekstrakcijos metodu kraujo ląstelės buvo lizuojamos buferiniu tirpalu (320 mM sacharozės, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM MgCl₂·6H₂O, 1% Triton X-100), atsiskyre ląstelių branduoliai buvo suspenduojami buferiniame tirpale (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% natriododecilsulfato (SDS), pH 7,5). DNR gryninimas atliktas fenolio ir chloroformo tirpalų mišiniu, nusodinimas – etanolio tirpalu. DNR buvo išdžiovinama ir saugoma kambario temperatūroje.

3.2.5. Išgrynintos DNR kokybės nustatymas

Kiekvienu atveju išgrynintos DNR kokybę nustatyta spektrofotometru (*BioPhotometer, Eppendorf*, Vokietija), išmatuojant DNR kiekį ir įvertinant švarumą. Kokybinė DNR analizė atlikta išmatavus optinį tankį 280 nm ilgio bangos šviesoje. Santykis A_{260}/A_{280} parodo DNR grynumą. DNR yra švari, kai šis dydis didesnis nei 1,5. Geriausiai, jei šis santykis yra 1,7–1,9. Mažesnis santykis rodo, kad DNR mėginyje yra baltymų arba organinių medžiagų, didesnis – esama RNR.

3.2.6. Mikrosatelitų nestabilumo nustatymas

Buvo naudojama mikrosatelitų žymenų sudėtinė sistema (*MSI Analysis System, Version 1.2, Promega Corporation, JAV*), skirta nustatyti mikrosatelitų nestabilumui žmogaus ląstelėse. Naudoti *Promega Corporation* du žymenų rinkiniai – jau taikomas praktikoje žymenų rinkinys ir naujai sukurtas rinkinys. Pirmąjį analizės rinkinį sudaro fluorescuojančiais dažais pažymėti pradmenys, skirti septynių genetinių sričių analizei, kurių penkios (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27) yra vieno nukleotido

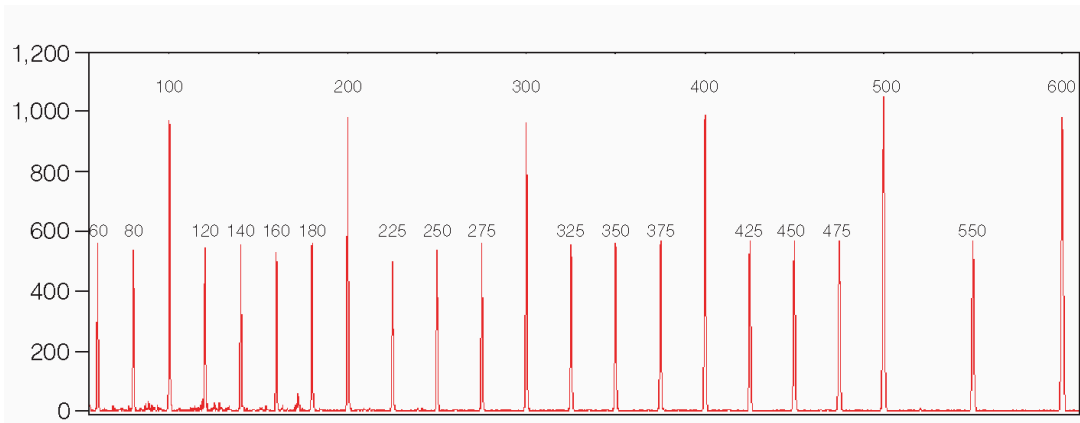
trumposios pasikartojančios sekos ir dvi (Penta C ir Penta D) – penkių nukleotidų pasikartojančios sekos. Dvi penkių nukleotidų pasikartojančios sekos naudojamos siekiant nustatyti, jog naviko ir sveiko audinio (mūsų tyrime kraujo) DNR mėginiai priklauso tam pačiam individui. Mikrosatelitų nestabilumo analizės sistemos informacija pateikiama 6-oje lentelėje.

6 lentelė. Genetinių sričių apibūdinimas

Žymens pavadinimas	<i>GenBank</i> ® ¹ numeris	Pasikartojanti seka	Pasikartojančio fragmento ilgio ribos (np) ²	K562 alelių ilgiai (np) ³	Pradmens dažas ⁴
NR-21	XM_033393	(A) ₂₁	94-101	101	JOE
BAT-26	U41210	(A) ₂₆	103-115	113	FL
BAT-25	L04143	(A) ₂₅	114-124	122	JOE
NR-24	X60152	(A) ₂₄	130-133	130	TMR
MONO-27	AC007684	(A) ₂₇	142-154	150	JOE
Penta C	AL138752	(AAAAG) ₃₋₁₅	143-194	164, 174	TMR
Penta D	AC000014	(AAAAG) ₂₋₁₇	135-201	168, 187	FL

¹ *GenBank*® - nukleotidų sekų duomenų bazė; ² Pasikartojančio fragmento ilgio ribos – nustatomos *ABI PRISM*® 3100 genetiniu analizatoriumi (*Promega Corporation*, JAV) naudojant POP-4™ polimerą (angl. *Performance Optimized Polymer*) ir 36 cm kapiliaro modulį; ³ K562 – naudojamas *Promega Corporation* (JAV) žmogaus genomines DNR palyginamasis mėginys; ⁴ Pradmens dažas: JOE – 6-karboksi-4',5'-dichloro-2',7'-dimetoksifluoresceinas; FL – fluoresceinas; TMR – karboksi-tetrametilrodaminas.

Fluorescentinis išorinis ilgio standartas (ILS 600; angl. *Internal Lane Standard*) sudarytas iš 22 pasikartojančių DNR fragmentų (60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 ir 600 np ilgio), žymėtų karboksi-X-rodaminu (CXR) (7 pav.).



7 pav. Išorinis ilgio standartas 600

Naująjį rinkinį sudaro 5 žymenys – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59, kurie yra ilgosios poliA pasikartojančios sekos.

Mikrosatelitų nestabilumui nustatyti naudotas PGR metodas. Toliau aprašoma darbo eiga:

- steriliame 1,5 ml talpos mėgintuvėlyje paruošiamas PGR mišinys. Mišiniui reikalingų komponentų kiekis pateiktas 7-oje lentelėje. Paruoštas mišinys gerai sumaišomas ir centrifuguojamas;
- į sterilius 0,2 ml talpos mėgintuvėlius įpilama po 8 μ l paruošto PGR mišinio;
- į kiekvieną mėgintuvėlį su PGR mišiniu pridedama po 2 μ l tiriamos DNR tirpalo (1–2 ng);
- į teigiamos kontrolės mėgintuvėlį pridedama 2 ng kontrolinės DNR K562 tirpalo, o į neigiamos kontrolės mėgintuvėlį – 2 μ l dejonizuoto vandens;

- paruošti mėgintuvėliai sudedami į termociklerį ir įjungama reikalinga programa. PGR programos temperatūrinis režimas nurodytas 8-oje lentelėje.

Pagausintų DNR fragmentų ilgiai buvo nustatomi *ABI PRISMTM 3100* genetiniu analizatoriumi (*Promega Corporation, JAV*).

7 lentelė. Polimerazės grandininės reakcijos mišiniui reikalingų komponentų kiekis vienam mėginiui

Komponentas	Kiekis (μl)
Dejonizuotas vanduo	5,85
<i>Gold STAR</i> 10x buferis	1,00
Mikrosatelitų pradmenys	1,00
<i>AmpliTag Gold</i> DNR polimerazė (5u/μl)	0,15
Iš viso:	8,00

8 lentelė. Polimerazės grandininės reakcijos temperatūrinis režimas

Nr.	Temperatūra (° C)	Trukmė	Ciklų skaičius
1.	95	11 min.	1
2.	96	1 min.	1
3.	94	30 s	10
	58	30 s	
	70	1 min.	
4.	90	30 s	20
	58	30 s	
	70	1 min.	
5.	60	30 min.	1

3.2.7. Mikrosatelitų nestabilumo vertinimas

Mikrosatelitų nestabilumas vertintas remiantis Nacionalinio vėžio instituto (JAV) rekomendacijomis: jei mažiausiai 2 iš 5 žymenų rodo skirtumus tarp navikinio ir sveiko audinio DNR, tokie navikai vertinami kaip pasižymintys mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumu ir vadinami mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo navikais (MSI-H), o navikai, kurių tik vienas žymuo rodo neatitikimą – tai mikrosatelitų mažo dažnio nestabilumo navikai (MSI-L), navikai, kurių nė vienas iš žymenų nerodo skirtumų tarp navikinio ir sveiko audinio DNR – tai mikrosatelitų stabilumą turintys navikai (MSS).

Mūsų darbe, atliekant statistinę duomenų analizę, pastarosios 2 grupės (MSI-L ir MSS), kaip rekomenduoja kiti tyrėjai [148], apjungtos į vieną – mikrosatelitų stabilumą turinčių navikų (MSS) grupę.

3.2.8. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos nustatymas

Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiška parafininiuose pjūviuose analizuota imunohistocheminiu tyrimo metodu naudojant *Dako* dažymo automatą (*AutostainerLink 48*, *DAKO*, *Glostrup*, Danijos Karalystė). Parafininiai pjūviai po deparafinavimo ksilenu ir dehidratavimo etanolio tirpalu perkelti į *Dako* antigenų epitopų atstatymo buferinį tirpalą (*Target* pH 9,0), laikyti 20 min. 97° C temperatūroje. Endogeninė peroksidazė blokuota *EnVision FLEX* peroksidazės blokavimo reagentu. Vėliau pjūviai inkubuoti monokloniniais antikūnais 30 min. kambario temperatūroje naudojant *Dako EnVision FLEX+* detekcijos sistemą (*DAKO*, *Glostrup*, Danijos Karalystė). Naudoti šie antikūnai (Ak): monokloninis pelės Ak prieš žmogaus MSH2 (santykiu 1:30, klonas – 25D12, *Novocastra*), monokloninis pelės Ak prieš žmogaus MSH6 (santykiu 1:40, klonas – 44, *Cell Marque*), monokloninis pelės Ak prieš žmogaus MLH1 (santykiu 1:25, klonas – G168-728, *Cell Marque*) ir monokloninis pelės Ak

prieš žmogaus PMS2 (santykiu 1:30, klonas – MRQ-28, *Cell Marque*). Imunohistocheminės reakcijos pabaigoje pjūviai 10 min. inkubuoti DAB+ chromogenu, kontrastuoti Mayer hematoksilinu ir uždengti dengiamaisiais stikleliais. Teigiamai imunohistocheminio testo kontrolei naudota audinių mikrogardelė; neigiama kontrolė atlikta tuose pačiuose pjūviuose, praleidus imunohistocheminio tyrimo reakcijoje vykdomo pirminio antikūno uždėjimo etapą.

Skaitmeniniai vaizdai skenuoti *Aperio ScanScope XT* objektinių stiklelių skaneriu (*Aperio Technologies, Vista*, Kalifornija, JAV) 20x padidiniu.

3.2.9. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant „SPSS 20.0“ ir „Stata 11.0“ programinės įrangos paketus. Kiekybiniams požymiams vertinti skaičiuoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai, minimali bei maksimali reikšmės; kokybiniams – reikšmių dažniai ir santykiniai dažniai procentais. Kiekybinių duomenų normalumo sąlygos įvertinimui taikytas Šapiro-Vilko (angl. *Shapiro-Wilk*) testas. Dviejų grupių duomenų vidurkių skirtumai buvo palyginti naudojant Stjudento (angl. *Student*) *t* kriterijų. Kokybinių požymių nepriklausomumui vertinti buvo taikomas chi-kvadratu (χ^2) kriterijus ir Fišerio (angl. *Fisher*) tikslusis testas. Dvinariams kokybiniams kintamiesiems pasiskirsčius pagal binominį skirstinį, apskaičiuoti šių kintamųjų tikimybės pasikliautiniai intervalai (PI). Pacienčių išgyvenamumui vertinti naudoti Kaplano-Mejerio (angl. *Kaplan-Meier*) bei Kokso regresijos (angl. *Cox regression*) metodai, išgyvenamumo kreivėms palyginti – *log rank* kriterijus. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, jeigu palyginimui naudoto kriterijaus *p* reikšmė buvo mažesnė už reikšmingumo lygmenį α ($\alpha=0,05$). Visos pateiktos *p* reikšmės skirtos tikrinti dvipusėms hipotezėms.

4. REZULTATAI

4.1. Mikrosatelitų nestabilumas sergant gimdos kūno vėžiu

Parinkus du – jau taikomą (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27) ir naująjį (BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59) *Promega Corporation* (JAV) žymenų rinkinius, visoms pacientėms, kurios buvo įtrauktos į tyrimą (n=109), atlikta mikrosatelitų nestabilumo analizė.

4.1.1. Mikrosatelitų nestabilumo analizė naudojant žymenis BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27

Panaudojus BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27 žymenis, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo fenotipas (≥ 2 žymenys iš 5) nustatytas 17 iš 109 atvejų (15,60 proc.; 95 proc. PI 9,36–23,79), o mažo dažnio (n=6) ir mikrosatelitų stabilumas (n=86) kartu sudėjus – 84,40 proc. (n=92) atvejų.

Mikrosatelitų nestabilumas nustatytas gimdos kūno navikuose ir to paties individo sveikame audinyje – kraujyje. Naudojant minėtą 5 žymenų rinkinį skirtumai tarp tirtų genomo vietų nustatyti:

- 2 iš 5 žymenų skirtumai nustatyti 6 iš 17 atvejų (35,29 proc.);
- 3 iš 5 žymenų atitinkamai 5 iš 17 atvejų (29,41 proc.);
- 4 iš 5 žymenų atitinkamai 5 iš 17 atvejų (29,41 proc.);
- 5 iš 5 žymenų atitinkamai 1 iš 17 atvejų (5,88 proc.).

Dažniausiai minėti skirtumai nustatyti naudojant BAT-26 ir MONO-27 žymenis (9 lent.).

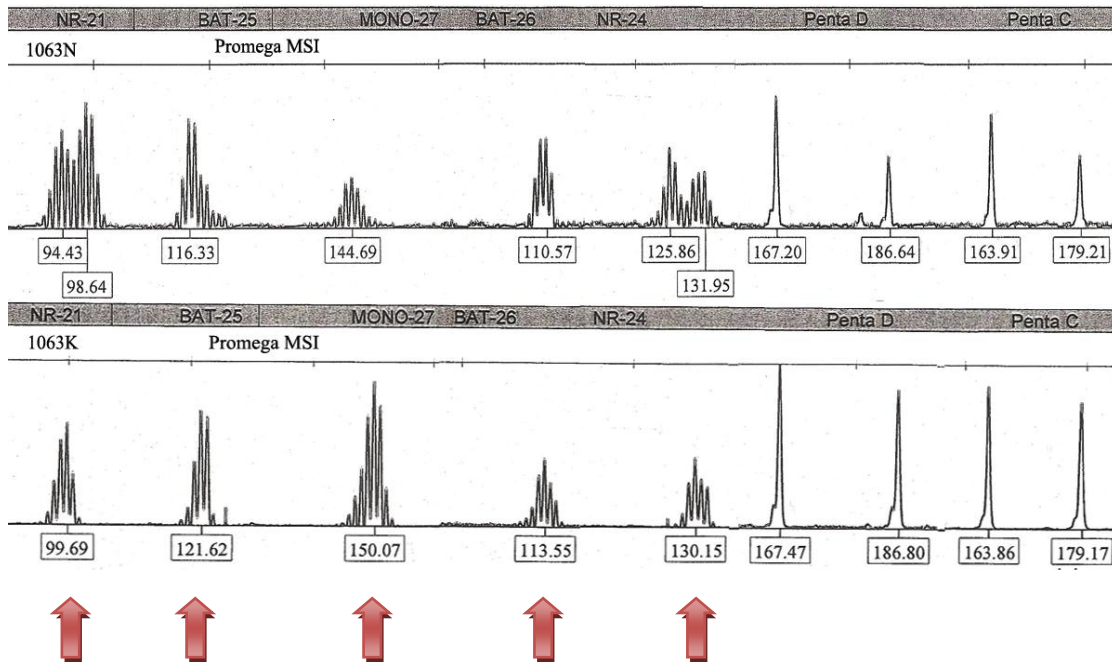
9 lentelė. Mikrosatelitų nestabilumo pasiskirstymas pagal skirtingas genomo vietas

Mikrosatelitų žymenys	MSI-H (n=17)		95 proc. PI
	n	proc.	
BAT-25	9	52,94	27,81–77,02
BAT-26	15	88,24	63,56–98,54
NR-21	7	41,18	18,44–67,08
NR-24	5	29,41	10,31–55,96
MONO-27	16	94,12	71,31–99,85

MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; n – atvejų skaičius; PI – pasikliautinis intervalas.

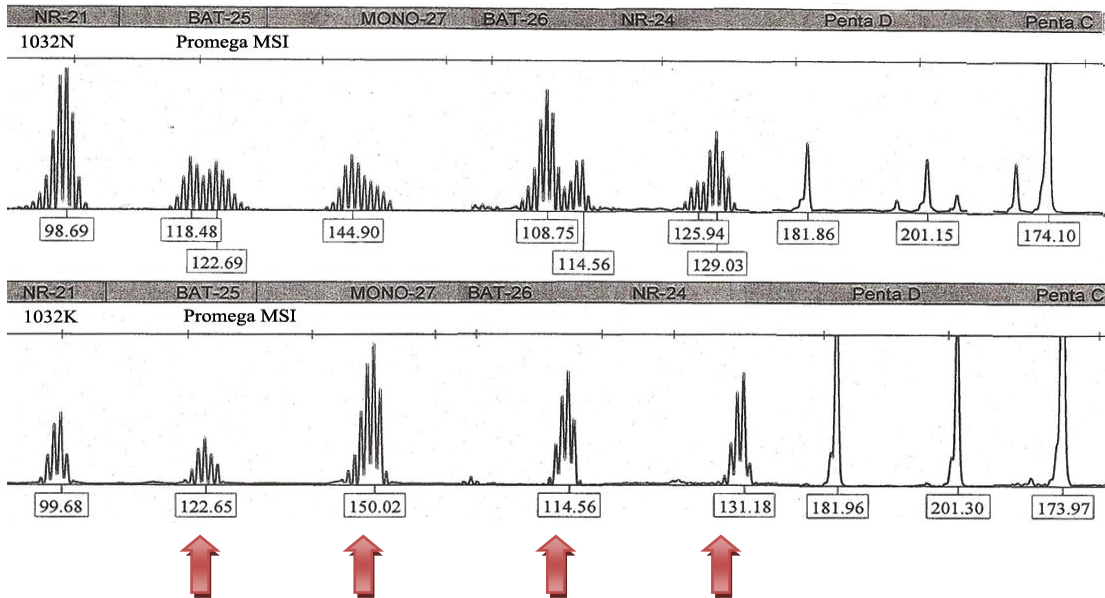
Pateikiame mikrosatelitų nestabilumo pavyzdžius (8 pav.).

a) pavyzdys



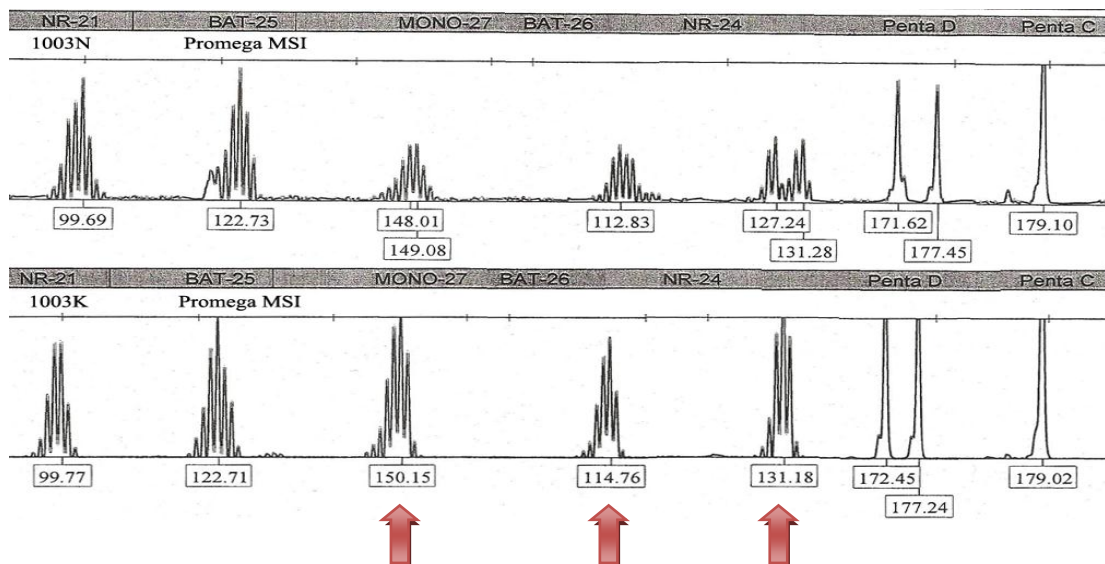
5 iš 5 tirtų genomo vietų matomas mikrosatelitų nestabilumas gimdos kūno naviko mėginyje

b) pavyzdys



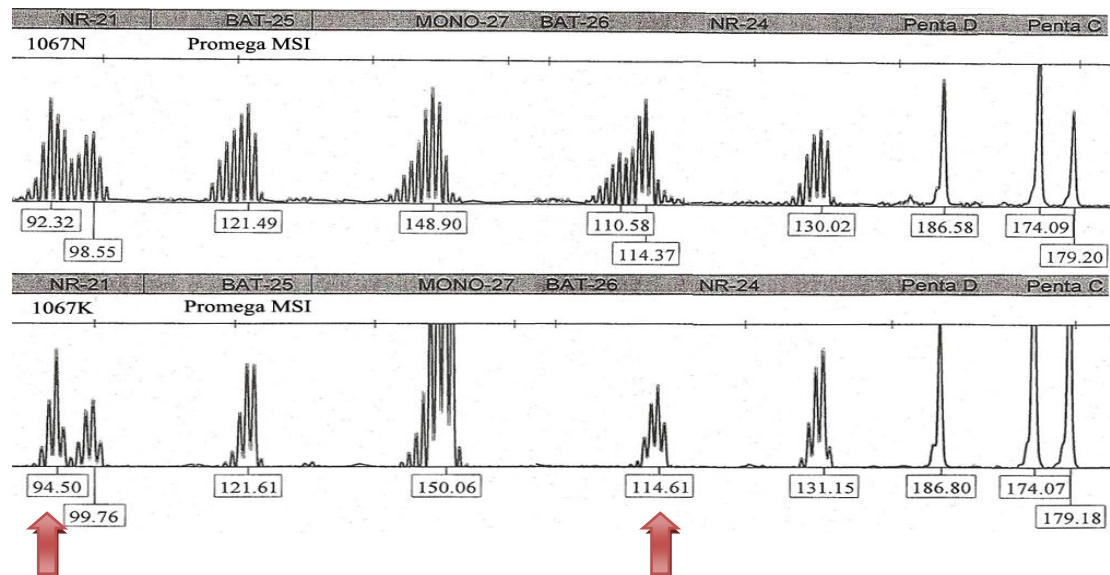
4 iš 5 tirtų genomo vietų matomas mikrosatelitų nestabilumas gimdos kūno naviko mėginyje

c) pavyzdys

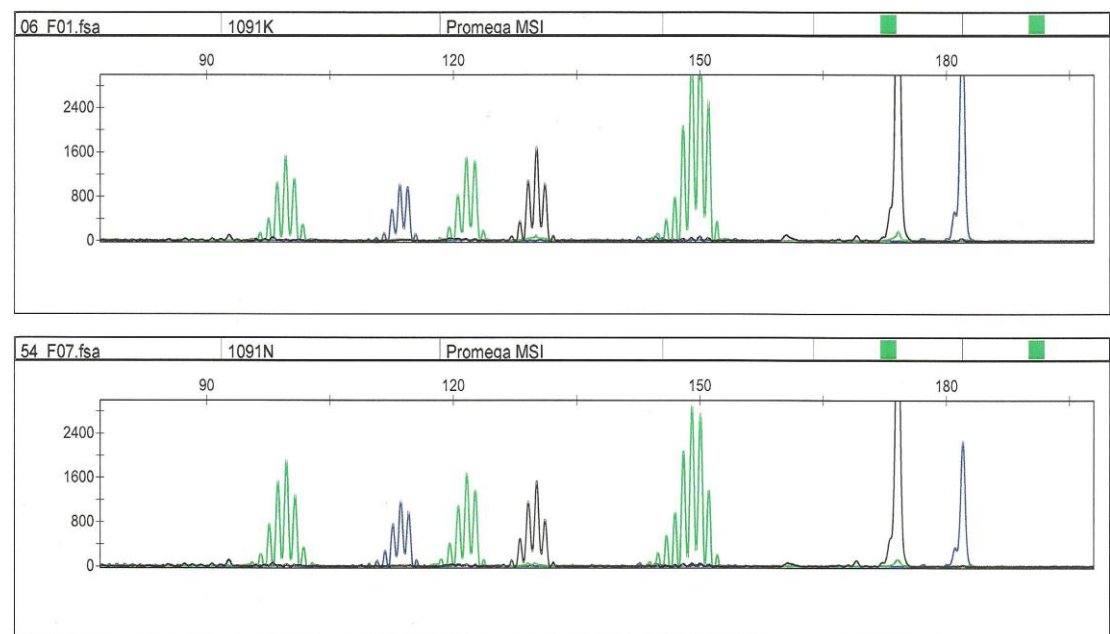


3 iš 5 tirtų genomo vietų matomas mikrosatelitų nestabilumas gimdos kūno naviko mėginyje

d) pavyzdys



2 iš 5 tirtų genomo vietų matomas mikrosatelitų nestabilumas gimdos kūno naviko mėginyje



e) pavyzdys

5 iš 5 tirtų genomo vietų mikrosatelitų skirtumų nėra (MSS)

Mikrosatelitų nestabilumas gimdos kūno naviko (N) bei to paties individo sveiko audinio – kraujo (K) mėginiuose. 1–2 ng genomines DNR abiem atvejais buvo amplifikuotos naudojant *Promega MSI Analysis System, Version 1.2* rinkinį. Amplifikacijos produktai analizuoti *ABI PRISM 3100* genetiniu analizatoriumi. Naudotas 5 žymenų rinkinys (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27); Penta D ir Penta C – kontrolinės genomo vietos, kurios neturi skirtis daugiau nei per 1 np navikiniame ir sveikame audinyje. Rodyklėmis pažymėti mikrosatelitų fragmentai, kurių ilgis skiriasi palyginus naviko ir sveiko audinio mikrosatelitų fragmentus.

8 pav. Mikrosatelitų nestabilumo pavyzdžiai

Kiekvieno atvejo, kai nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas, pacienčių ir navikų charakteristikos pateiktos 10-oje lentelėje.

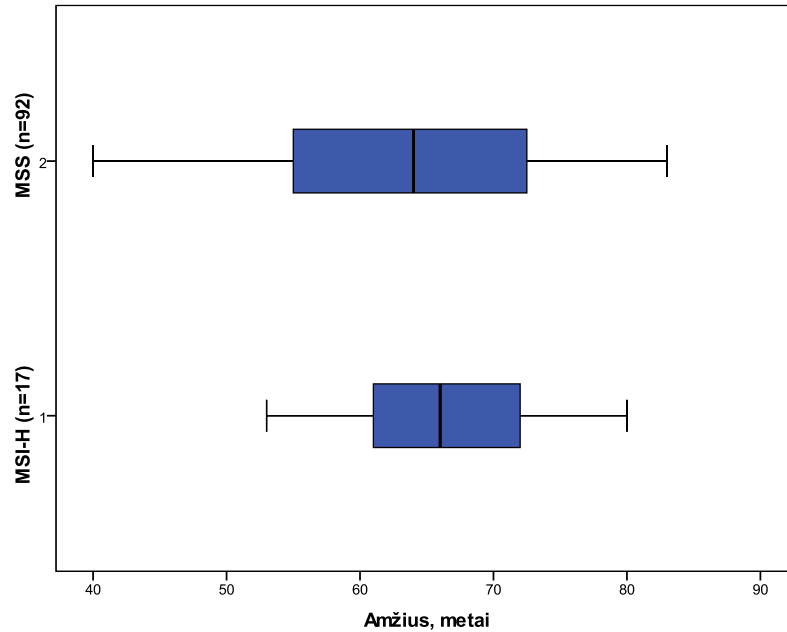
10 lentelė. Kiekvieno atvejo, esant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumui, charakteristikos (n=17)

Pacienčių charakteristikos		Naviko charakteristikos			Nustatytų žymenų skaičius
amžius, metai	KMI, kg/m ²	diferenciacijos laipsnis	FIGO stadija	Invazija į miometriumą	
71	25,2	G2	IA	nėra	2/5
68	28,3	G2	IA	nėra	4/5
54	28,7	G1	IA	nėra	3/5
74	36,8	G3	IA	< 1/2	4/5
72	46,1	G1	IA	< 1/2	2/5
61	36,3	G2	IA	≥ 1/2	5/5
63	30,1	G2	IA	≥ 1/2	2/5
72	36,6	G3	IB	≥ 1/2	3/5
67	26,0	G3	IB	≥ 1/2	2/5
58	23,1	G2	IB	≥ 1/2	3/5

80	26,0	G2	IB	$\geq 1/2$	2/5
66	19,4	G2	IB	$\geq 1/2$	3/5
73	21,3	G3	IB	$\geq 1/2$	2/5
61	36,0	G3	IIIA	$\geq 1/2$	4/5
63	27,3	G2	IIIC	$\geq 1/2$	4/5
53	24,7	G3	IIIC	$\geq 1/2$	4/5
61	37,2	G2	IVB	$\geq 1/2$	3/5

KMI – kūno masės indeksas; G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; FIGO – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija; IA – navikas tik endometriume arba infiltravęs mažiau kaip pusę miometriumo; IB – navikas infiltravęs pusę arba daugiau kaip pusę miometriumo; IIIA – navikas infiltravęs gimdos kūno serozinį sluoksnį ir (ar) gimdos priklausinius; IIIC – yra metastazių dubens ir (ar) paraaortiniuose limfmazgiuose; IVB – yra tolimųjų metastazių; nėra – navikas tik endometriume; $< 1/2$ – navikas infiltravęs mažiau nei pusę miometriumo; $\geq 1/2$ – navikas infiltravęs pusę arba daugiau miometriumo.

Moterų, kurioms nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas ($n=17$), amžiaus vidurkis buvo 66 ± 7 metai (ribos: 53–80 m.) ir statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p=0,534$) nuo amžiaus vidurkio – 64 ± 10 metų (ribos: 40–83 m.) moterų, kurioms nustatytas stabilus mikrosatelitų fenotipas ($n=92$). Minėtoje grupėje didžiausią dalį (8 iš 17; 47,06 proc.) sudarė nuo 60 iki 70 metų amžiaus pacientės. Reikia pažymėti, kad šioje grupėje nebuvo 50 metų amžiaus bei jaunesnių moterų; tik 3 iš 17 (17,65 proc.) buvo nuo 53 iki 60 metų amžiaus (9 pav.).

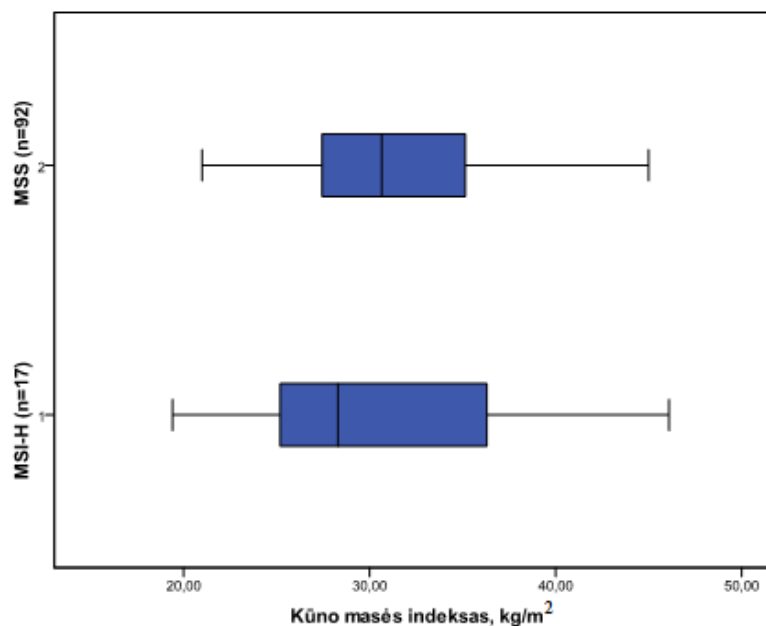


MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas.

9 pav. Mikrosatelitų nestabilumas ir moterų amžius

Pacienčių, kurioms nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas, KMI vidurkis buvo $29,9 \pm 7,1$ kg/m² (ribos: 19,4–46,1) ir statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p=0,360$) nuo KMI vidurkio – $31,3 \pm 5,2$ kg/m² (ribos: 21,0–45,0) moterų, kurioms nustatytas mikrosatelitų stabilus fenotipas. Minėtoje grupėje didžiausią dalį (7 iš 17; 41,18 proc.) sudarė nutukusios moterys, kurių KMI buvo 30,0 kg/m² ir daugiau; 6 pacientės (35,29 proc.) turėjo antsvorį ir jų KMI buvo 25,0–29,9 kg/m²; normalus kūno masės svoris konstatuotas 4 pacientėms iš 17 (23,53 proc.), jų KMI buvo 18,5–24,9 kg/m².

Tarp į tyrimą įtrauktų pacienčių nebuvo nė vienos turėjusios per mažą kūno svorį moters, kurios KMI būtų mažesnis nei 18,5 kg/m² (10 pav.).



MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas.

10 pav. Mikrosatelitų nestabilumas ir moterų kūno masės indeksas

Duomenys apie mikrosatelitų nestabilumo dažnį bei pobūdį ir apie histologinius navikų tipus pateikti 11-oje lentelėje. Mūsų tyrime endometrioidinio tipo adenokarcinoma arba I histologinis tipas nustatytas 100 iš 109 atvejų (91,74 proc.; 95 proc. PI 84,90–96,15) ir tik 9 iš 109 atvejų (8,26 proc.; 95 proc. PI 3,85–15,10) – neendometrioidinio tipo adenokarcinoma arba II histologinis tipas.

11 lentelė. Mikrosatelitų nestabilumas ir histologiniai navikų tipai

Histologinis naviko tipas	Pacienčių skaičius	MSI-H		MSS	
		n	proc.	n	proc.
Visi tipai	109	17	15,60	92	84,40
Endometrioidinė adenokarcinoma	100	17	17,00	83	83,00
Serozinė adenokarcinoma	3	0	-	3	100

Šviesiųjų ląstelių karcinoma	1	0	-	1	100
Adenosarkoma	5	0	-	5	100

MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas; n – atvejų skaičius.

Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas tik endometrioidinio tipo adenokarcinomose: 17 iš 100 atvejų (17,00 proc.; 95 proc. PI 10,23–25,82) ir nei vienu iš 9 atvejų esant neendometrioidinio tipo adenokarcinomai. Reikia pažymėti, kad pastarojo tipo navikų skaičius buvo mažas, todėl statistiniai apibendrinimai negalėjo būti pateikti. Taigi, sąsaja tarp naviko klinikinių-patologinių charakteristikų ir mikrosatelitų nestabilumo analizuota tik endometrioidinio tipo adenokarcinomose ir rezultatai pateikti 12-oje lentelėje.

12 lentelė. Mikrosatelitų nestabilumas ir naviko klinikinės-patologinės charakteristikos

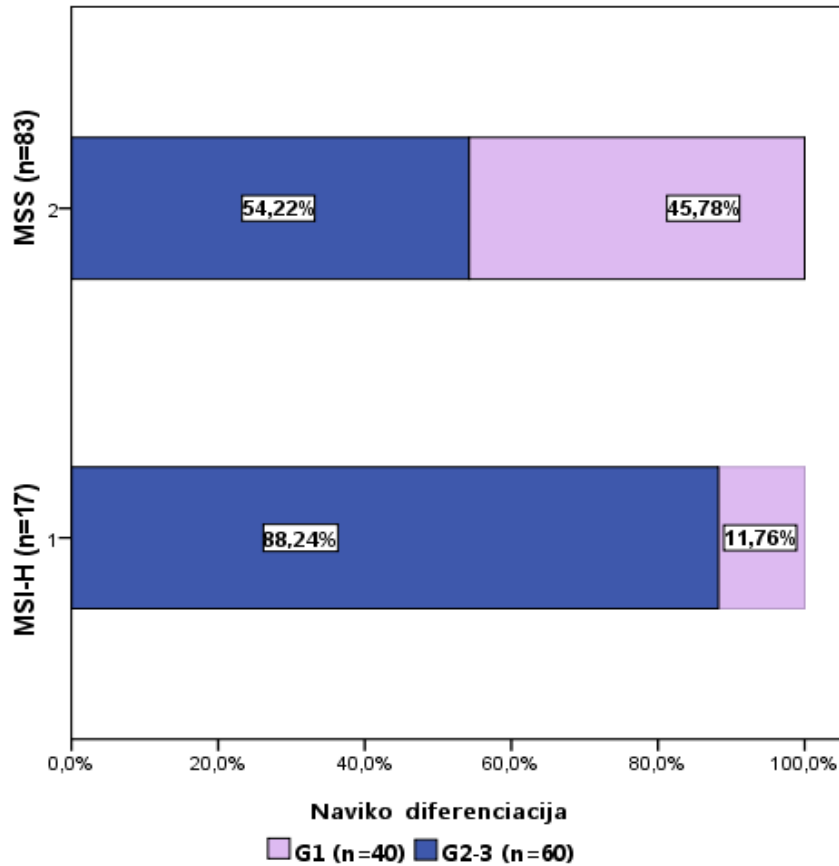
Charakteristikos	Pacienčių skaičius	MSI-H		MSS		<i>p</i>
		n	proc.	n	proc.	
Bendras atvejų skaičius	100	17	17,00	83	83,00	
Diferenciacijos laipsnis						
G1	40	2	5,00	38	95,00	0,005*
G2	46	9	19,57	37	80,43	
G3	14	6	42,86	8	57,14	
Invazija į miometriumą						
< 1/2	62	5	8,06	57	91,94	0,049*
≥ 1/2	38	12	31,58	26	68,42	
FIGO stadija						
I	84	13	15,48	71	84,52	0,100

II	6	-	-	6	100,0
III-IV	10	4	40,00	6	60,00

MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas; G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; FIGO – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija; I stadija – navikas neišplitęs už gimdos kūno ribų; II stadija – navikas infiltravęs gimdos kaklelio stromą, bet neišplitęs už gimdos kaklelio ribų; III stadija – lokalus arba regioninis naviko išplitimas; IV stadija – navikas infiltravęs šlapimo pūslės ir (ar) tiesiosios žarnos gleivinę ir (ar) yra tolimųjų metastazių; < 1/2 – navikas tik endometriume ar infiltravęs mažiau nei pusę miometriumo; ≥ 1/2 – navikas infiltravęs pusę arba daugiau miometriumo; n – atvejų skaičius; * – statistiškai reikšmingas skirtumas.

Kaip matyti iš 12-oje lentelėje pateiktų duomenų, statistiškai reikšmingi skirtumai tarp grupių (MSI-H ir MSS) nustatyti priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio ($p=0,005$) ir naviko invazijos į miometriumą gylio ($p=0,049$).

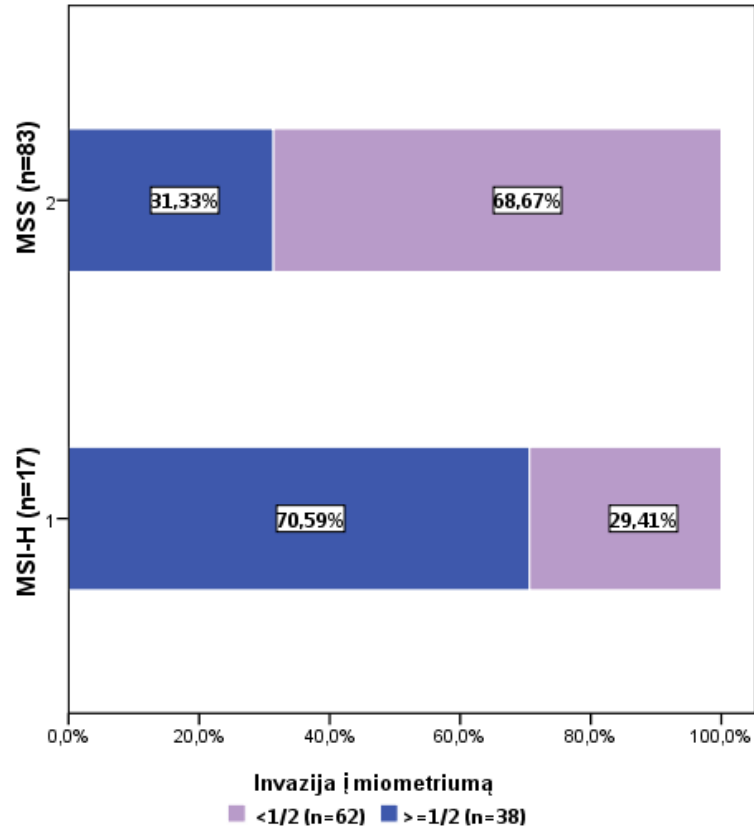
Grupėje, kurioje nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas, vidutinės ir blogos diferenciacijos navikų konstatuota 15 iš 17 atvejų (88,24 proc.; 95 proc. PI 63,56–98,54), o grupėje, kurioje nustatytas stabilus mikrosatelitų fenotipas, šių navikų rasta 45 iš 83 atvejų (54,22 proc.; 95 proc. PI 42,92–65,21) (11 pav.)



MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas;
 G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2-3 – vidutiniškai ir blogai diferencijuoti
 navikai; n – atvejų skaičius.

11 pav. Mikrosatelitų nestabilumas ir naviko diferenciacijos laipsnis

Grupėje, kurioje nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas, 12 iš 17 atvejų (70,59 proc.; 95 proc. PI 44,04–89,69) konstatuota, jog navikas infiltravęs pusę arba daugiau miometriumo, o grupėje, kurioje nustatytas stabilus mikrosatelitų fenotipas – 26 iš 83 atvejų (31,32 proc.; 95 proc. PI 21,59–42,44) (12 pav.).



MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas; $< 1/2$ – navikas tik endometriume ar infiltravęs mažiau nei pusę miometriumo; $\geq 1/2$ – navikas infiltravęs pusę arba daugiau nei pusę miometriumo; n – atvejų skaičius.

12 pav. Mikrosatelitų nestabilumas ir naviko invazija į miometriumą

Statistiškai reikšmingos sąsajos tarp ligos (FIGO) stadijos ir mikrosatelitų nestabilumo nenustatyta ($p=0,100$).

Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad, naudojant *Promega Corporation* žymenis – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas 15,60 proc. (n=109) pacienčių, sergančių gimdos kūno vėžiu; visais atvejais diagnozuota endometrioidinė adenokarcinoma. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp grupių (MSI-H ir MSS) konstatuoti priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio ($p=0,005$) ir invazijos į miometriumą gylio ($p=0,049$).

4.1.2. Mikrosatelitų nestabilumo analizė naudojant žymenis BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59

Panaudojus *Promega Corporation* naujai sukurtus žymenis – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo fenotipas (≥ 2 žymenys iš 5) nustatytas 30 iš 109 atvejų (27,52 proc.; 95 proc. PI 19,40–36,90), o mažo dažnio (n=5) ir mikrosatelitų stabilumas (n=74) kartu sudėjus – 72,48 proc. (n=79) atvejų.

Naudojant naują 5 žymenų rinkinį skirtumai tarp tirtų genomo vietų nustatyti:

- 2 iš 5 žymenų skirtumai nustatyti 7 iš 30 atvejų (23,33 proc.);
- 3 iš 5 žymenų atitinkamai 5 iš 30 atvejų (16,67 proc.);
- 4 iš 5 žymenų atitinkamai 13 iš 30 atvejų (43,33 proc.);
- 5 iš 5 žymenų atitinkamai 5 iš 30 atvejų (16,67 proc.).

Reikia pažymėti, kad dažniausiai skirtumai nustatyti naudojant keturis iš penkių žymenų: BAT-52, BAT-55, BAT-56 ir BAT-59 (13 lent.).

13 lentelė. Mikrosatelitų nestabilumo pasiskirstymas pagal skirtingas genomo vietas

Mikrosatelitų žymenys	MSI-H (n=30)		95 proc. PI
	n	proc.	
BAT-52	22	73,33	54,11–87,72
BAT-55	23	76,67	57,72–90,07
BAT-56	22	73,33	54,11–87,72
BAT-57	14	46,67	28,34–65,67
BAT-59	25	83,33	65,28– 94,36

MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; n – atvejų skaičius; PI – pasikliautinis intervalas.

Kiekvieno atvejo, kai nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas, pacienčių ir navikų charakteristikos pateiktos 14-oje lentelėje.

14 lentelė. Kiekvieno atvejo, esant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumui, charakteristikos (n=30)

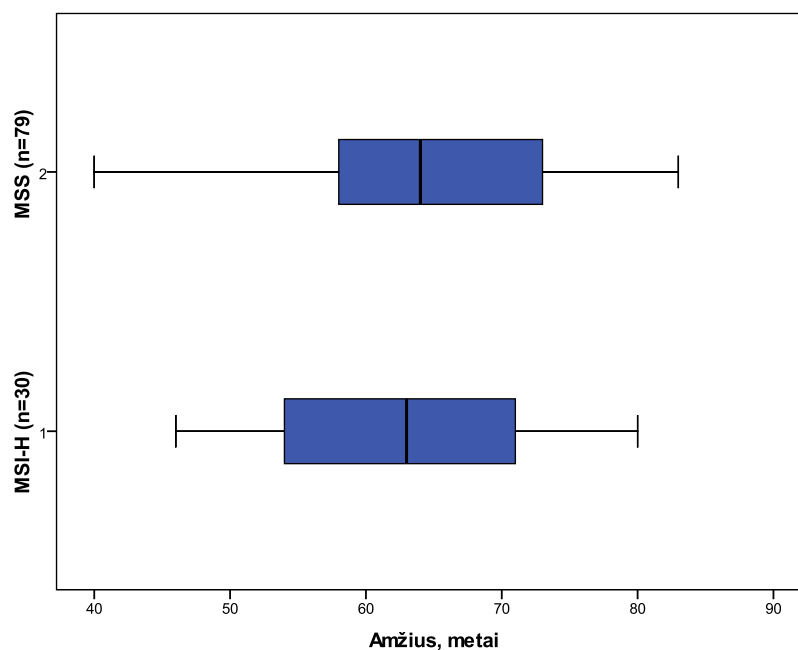
Pacienčių charakteristikos		Naviko charakteristikos			Nustatytų žymenų skaičius
amžius, metai	KMI	diferenciacijos laipsnis	FIGO stadija	invazija į miometriumą	
71	25,2	G2	IA	nėra	2/5
68	28,3	G2	IA	nėra	4/5
54	28,7	G1	IA	nėra	3/5
54	29,3	G1	IA	nėra	2/5
53	37,2	G1	IA	nėra	2/5
74	36,8	G3	IA	< 1/2	4/5
72	46,1	G1	IA	< 1/2	2/5
61	36,3	G3	IA	< 1/2	5/5
63	30,1	G2	IA	< 1/2	2/5
75	25,7	G2	IA	< 1/2	2/5
46	40,2	G2	IA	< 1/2	3/5
53	34,2	G1	IA	< 1/2	2/5
51	27,3	G1	IA	< 1/2	4/5
67	30,1	G2	IA	< 1/2	3/5
53	22,6	G2	IB	≥ 1/2	2/5
64	31,5	G3	IB	≥ 1/2	4/5
52	29,8	G2	IB	≥ 1/2	3/5
72	36,6	G3	IB	≥ 1/2	3/5

67	26,0	G3	IB	$\geq 1/2$	2/5
58	23,1	G2	IB	$\geq 1/2$	3/5
80	26,0	G2	IB	$\geq 1/2$	2/5
66	19,4	G2	IB	$\geq 1/2$	3/5
73	21,3	G3	IB	$\geq 1/2$	2/5
63	26,0	G1	IB	$\geq 1/2$	2/5
70	26,0	G2	IB	$\geq 1/2$	4/5
74	30,5	G2	IB	$\geq 1/2$	5/5
61	36,0	G2	IIIA	$\geq 1/2$	4/5
63	27,3	G2	IIIC	$\geq 1/2$	4/5
53	24,7	G3	IIIC	$\geq 1/2$	4/5
61	37,2	G2	IVB	$\geq 1/2$	3/5

KMI – kūno masės indeksas; G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; FIGO – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija; IA – navikas tik endometriume arba infiltravęs mažiau kaip pusę miometriumo; IB – navikas infiltravęs pusę arba daugiau kaip pusę miometriumo; IIIA – navikas infiltravęs gimdos kūno serozinį sluoksnį ir (ar) gimdos priklausinius; IIIC – yra metastazių dubens ir (ar) paraaortiniuose limfmazgiuose; IVB – yra tolimųjų metastazių; nėra – navikas tik endometriume; $< 1/2$ – navikas infiltravęs mažiau nei pusę miometriumo; $\geq 1/2$ – navikas infiltravęs pusę arba daugiau miometriumo.

Moterų, kurioms nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas (n=30), amžiaus vidurkis buvo 63 ± 9 metai (ribos: 46 – 80 m.) ir statistiškai reikšmingai, kaip ir pirmuoju atveju, nesiskyrė ($p=0,413$) nuo amžiaus vidurkio – 65 ± 10 metų (ribos: 40–83 m.) moterų, kurioms nustatytas mikrosatelitų stabilus fenotipas (n=79). Reikia pažymėti, kad minėtoje grupėje tik viena moteris buvo

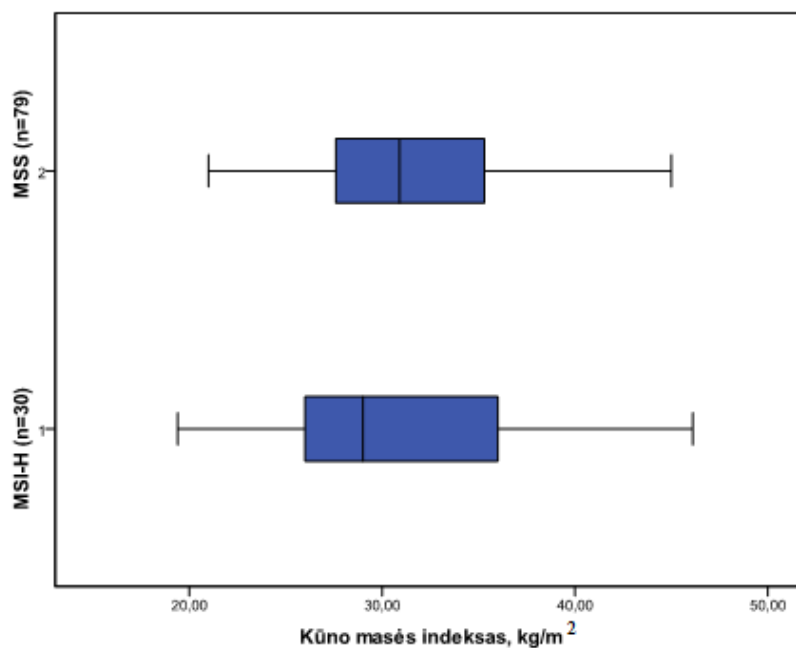
jaunesnė nei 50 metų amžiaus; 9 iš 30 (30,00 proc.) moterų buvo nuo 51 iki 60 metų amžiaus (13 pav.)



MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas.

13 pav. Mikrosatelitų nestabilumas ir moterų amžius

Pacienčių, kurioms nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas, KMI vidurkis buvo $30,0 \pm 6,1$ kg/m^2 (ribos: 19,4–46,1) ir statistiškai reikšmingai, kaip ir pirmuoju atveju, nesiskyrė ($p=0,204$) nuo KMI vidurkio – $31,5 \pm 5,2$ kg/m^2 (ribos: 21,0–45,0) moterų, kurioms nustatytas mikrosatelitų stabilus fenotipas (14 pav.).



MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas.

14 pav. Mikrosatelitų nestabilumas ir moterų kūno masės indeksas

Duomenys apie mikrosatelitų nestabilumo dažnį bei pobūdį ir histologinius navikų tipus pateikti 15-oje lentelėje.

15 lentelė. Mikrosatelitų nestabilumas ir histologiniai navikų tipai

Histologinis naviko tipas	Pacienčių skaičius	MSI-H		MSS	
		n	proc.	n	proc.
Visi tipai	109	30	27,52	79	72,48
Endometrioidinė adenokarcinoma	100	30	30,00	70	70,00
Serozinė adenokarcinoma	3	0	-	3	100
Šviesiųjų ląstelių karcinoma	1	0	-	1	100
Adenosarkoma	5	0	-	5	100

MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas; n – atvejų skaičius.

Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas, kaip ir naudojant anksčiau sukurtą žymenų rinkinį, tik endometrioidinio tipo adenokarcinomose: 30 iš 100 atvejų (30,00 proc.; 95 proc. PI 21,24–39,98) ir nė vienu iš 9 atvejų esant neendometrioidinio tipo adenokarcinomai. Taigi, sąsaja tarp naviko klinikinių-patologinių charakteristikų ir mikrosatelitų nestabilumo analizuota, kaip ir pirmuoju atveju, tik endometrioidinio tipo adenokarcinomose ir rezultatai pateikti 16-oje lentelėje.

16 lentelė. Mikrosatelitų nestabilumas ir naviko klinikinės-patologinės charakteristikos

Charakteristikos	Pacienčių skaičius	MSI-H		MSS		p
		n	proc.	n	proc.	
Bendras atvejų skaičius	100	30	30,00	70	70,00	-
Diferenciacijos laipsnis						
G1	40	7	17,50	33	82,50	0,042*
G2	46	16	34,78	30	65,22	
G3	14	7	50,00	7	50,00	
Invazija į miometriumą						
< 1/2	62	14	22,58	48	77,42	0,046*
≥ 1/2	38	16	42,11	22	57,89	
FIGO stadija						
I	84	26	30,95	58	69,05	0,234
II	6	-	-	6	100,0	
III-IV	10	4	40,00	6	60,00	

MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas; G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 –

blogai diferencijuotas navikas; FIGO – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija; I stadija – navikas neišplitęs už gimdos kūno ribų; II stadija – navikas infiltravęs gimdos kaklelio stromą, bet neišplitęs už gimdos kaklelio ribų; III stadija – lokalus arba regioninis naviko išplitimas; IV stadija – navikas infiltravęs šlapimo pūslės ir (ar) tiesiosios žarnos gleivinę ir (ar) yra tolimųjų metastazių; $< 1/2$ – navikas tik endometriume ar infiltravęs mažiau nei pusę miometriumo; $\geq 1/2$ – navikas infiltravęs pusę arba daugiau miometriumo; n – atvejų skaičius; * – statistiškai reikšmingas skirtumas.

Kaip matyti iš 16-oje lentelėje pateiktų duomenų, statistiškai reikšmingi skirtumai tarp grupių (MSI-H ir MSS) nustatyti priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio ($p=0,042$) ir naviko invazijos į miometriumą gylio ($p=0,046$). Statistiškai reikšmingos sąsajos tarp ligos (FIGO) stadijos ir mikrosatelitų nestabilumo nenustatyta ($p=0,234$).

Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad, ištyrus 109 sergančiąsias gimdos kūno vėžiu, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas beveik du kartus dažniau (27,52 proc. atvejų) naudojant naujai sukurtus *Promega Corporation* žymenis – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59 negu anksčiau sukurtus ir taikomus (15,60 proc. atvejų) – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27 žymenis.

4.2. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2, MSH6, PMS2) raiška gimdos kūno navikuose

4.2.1. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2, MSH6, PMS2) raiškos analizė navikuose, kuriuose mikrosatelitų nestabilumas nustatytas naudojant žymenis BAT-25, BAT-26, Nr-21, NR-24 ir MONO-27

Šiame darbo etape imunohistocheminiai klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2, MSH6 ir PMS2) raiškos tyrimai atlikti tik tais atvejais, kuriais konstatuotas mikrosatelitų didelio

dažnio nestabilumas. Kaip minėta, panaudojus jau taikomą *Promega Corporation* žymenų rinkinį mikrosatelitų nestabilumas nustatytas 17 iš 109 atvejų. Imunohistocheminių tyrimų rezultatai parodė, kad net 16 iš 17 (94,12 proc.; 95 proc. PI 71,31–99,85) atvejų nenustatyta bent vieno minėto baltymo raiškos ir tik 1 iš 17 (5,88 proc.; 95 proc. PI 0,15–28,69) atvejų visų tirtų baltymų raiška buvo teigiama. Baltymų raiškos ir jos pasiskirstymo duomenys pateikti 17-oje lentelėje ir 15-ame paveiksle.

17 lentelė. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymas navikuose, kuriuose nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas (naviko histologinis tipas – endometrioidinė adenokarcinoma, n = 17)

Pacienčių amžius, metai	Naviko charakteristikos		Baltymo raiška			
	diferenciacijos laipsnis	FIGO stadija	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
71	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
72	G3	IB	nėra	nėra	yra	yra
72	G1	IA	nėra	nėra	yra	yra
63	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
61	G3	IIIA	nėra	nėra	yra	yra
58	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
80	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
66	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
68	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
61	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
74	G3	IA	nėra	nėra	yra	yra
63	G2	IIIC	nėra	nėra	nėra	nėra
73	G3	IB	yra	yra	yra	nėra

Pacienčių amžius, metai	Naviko charakteristikos		Baltymo raiška			
	diferenciacijos laipsnis	FIGO stadija	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
54	G1	IA	yra	yra	yra	nėra
53	G3	IIIC	yra	nėra	yra	yra
67	G3	IB	yra	nėra	yra	yra
61	G2	IVB	yra	yra	yra	yra

nėra – baltymo raiškos nėra; yra – baltymo raiška yra; G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; FIGO – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija; IA – navikas tik endometriume arba infiltravęs mažiau kaip pusę miometriumo; IB – navikas infiltravęs pusę arba daugiau kaip pusę miometriumo; IIIA – navikas infiltravęs gimdos kūno serozinį sluoksnį ir (ar) gimdos priklausinius; IIIC – yra metastazių dubens ir (ar) paraaortiniuose limfmazgiuose; IVB – yra tolimųjų metastazių.

Baltymas	Pacientės																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
MLH1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green
PMS2	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
MSH2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green
MSH6	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green
Amžius, metai	71	72	72	63	61	58	80	66	68	61	74	63	73	54	53	67	61
G	G2	G3	G1	G2	G3	G2	G2	G2	G2	G2	G3	G2	G3	G1	G3	G3	G2
FIGO stadija	IA	IB	IA	IA	IIIA	IB	IB	IB	IA	IA	IA	IIIC	IB	IA	IIIC	IB	IVB

G – naviko diferenciacijos laipsnis; raudona spalva – baltymų raiškos nėra; žalia spalva – baltymų raiška yra.

15 pav. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymas gimdos kūno navikuose

Iš 17-oje lentelėje ir 15-ame paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad MLH1 baltymo raiškos nenustatyta 12 atvejų (70,59 proc.; 95 proc. PI 44,04–89,69), PMS2 – 14 atvejų (82,35 proc.; 95 proc. PI 56,57–96,20), MSH6 – 3 atvejais (17,65 proc.; 95 proc. PI 3,80–43,43) ir MSH2 – 1 atveju (5,88 proc.; 95 proc. PI 0,15–28,69) iš 17 atvejų.

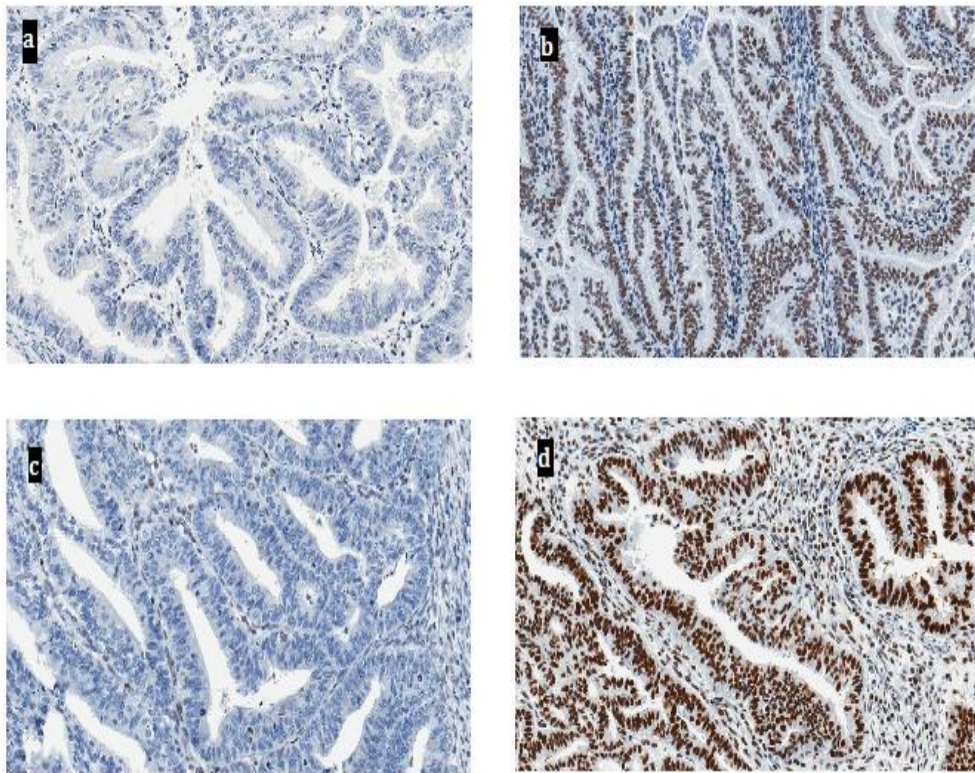
Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemai teisingai funkcionuoti būtinos abi baltymų MLH1/PMS2 ir MSH2/MSH6 poros. Mūsų tyrime sutampanti MLH1/PMS2 baltymų raiška nenustatyta dažniausiai – 12 iš 16 (75,00 proc.) atvejų, o sutampanti kitos iš dviejų būtinų baltymų poros – MSH2/MSH6 raiška nenustatyta tik 1 iš 16 (6,25 proc.) atvejų. Reikia pažymėti, kad šiuo atveju nenustatyta visų tirtų baltymų raiškos. Tarp minėtų MLH1/PMS2 bei MSH2/MSH6 baltymų porų po 2 (12,50 proc.) atvejus nebuvo nustatyta vieno iš baltymų – PMS2 arba MSH6 raiškos (18 lent.).

18 lentelė. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymas atsižvelgiant į jų funkciją (n = 16)

Baltymo raiška		Atvejų skaičius		95 proc. PI
		n	proc.	
MLH1	nėra	12	75,00	47,62–92,73
PMS2				
MSH2	nėra	1*	6,25	0,16–30,23
MSH6				
MLH1	yra	2	12,50	1,56–38,35
PMS2	nėra			
MSH2	yra	2	12,50	1,56–38,35
MSH6	nėra			

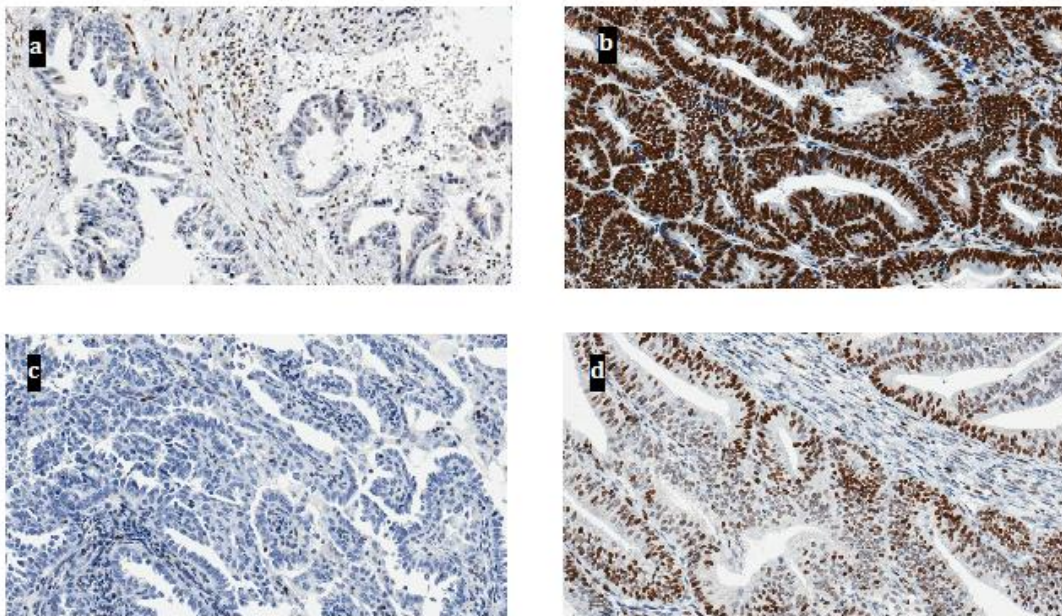
PI – pasikliautinis intervalas; *nebuvo visų tirtų baltymų raiškos; n – atvejų skaičius.

16-ame ir 17-ame paveiksluose pateikiami klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos endometrioidinėse adenokarcinomose imunohistocheminių tyrimų pavyzdžiai.



a) MLH1 baltymo raiškos nėra; b) MLH1 baltymo raiška yra; c) PMS2 baltymo raiškos nėra; d) PMS2 baltymo raiška yra

16 pav. MLH1 ir PMS2 baltymų raiška endometrioidinėje adenokarcinomoje



a) MSH2 baltymo raiškos nėra; b) MSH2 baltymo raiška yra; c) MSH6 baltymo raiškos nėra; d) MSH6 baltymo raiška yra

17 pav. MSH2 ir MSH6 baltymų raiška endometrioidinėje adenokarcinomoje

Dėl per mažo atvejų skaičiaus nebuvo galimybės statistiškai palyginti tirtų baltymų raiškos sutrikimo priklausomai nuo pacienčių ar naviko charakteristikų, todėl, pateikdami 19-oje lentelėje šias charakteristikas, siekėme tik parodyti, kaip tirti atvejai, kuriuose dėl vieno ar dviejų baltymų trūkumo nefunkcionuoja klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistema, pasiskirsto priklausomai nuo pacienčių amžiaus, kūno masės indekso, naviko diferenciacijos laipsnio bei ligos stadijos.

19 lentelė. Pacienčių pasiskirstymas atsižvelgiant į klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos sutrikimą (n = 16)

Charakteristikos	Nenustatyta dviejų baltymų raiškos n (proc.)		Nenustatyta vieno baltymo raiškos n (proc.)	
	MLH1- PSM2-	MSH2- MSH6-	PMS2- MLH1+	MSH6- MSH2+
Pacienčių skaičius	12 (75,00)	1* (6,25)	2 (12,50)	2 (12,50)
Amžiaus vidurkis (metai) ±SD	67±7	63	60±10	64±13
KMI vidurkis (kg/m ²) ±SD	30,9±7,5	27,0	25,3±0,9	25,0±5,2
Naviko histologinis tipas endometrioidinė adenokarcinoma	12 (100)	1(100)	2(100)	2(100)
Diferenciacijos laipsnis				
G1	1 (8,33)	0	0	1(50,00)
G2	8 (66,67)	1(100)	0	0
G3	3 (25,00)	0	2(100)	1(50,00)
FIGO stadija				
I	10 (83,33)	0	1(50,00)	2(100)
II	0	0	0	0
III-IV	2 (16,67)	1(100)	1(50,00)	0

*nebuvo visų tirtų baltymų raiškos; n – atvejų skaičius; SD – standartinis nuokrypis; - baltymo raiškos nėra; + baltymo raiška yra; KMI – kūno masės indeksas.

Iš 19-oje lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad sutampantis MLH1/PSM2 baltymų raiškos trūkumas nustatytas vyresnio amžiaus pacientėms (amžiaus vidurkis – 67 ± 7 m.), kurių KMI (vidurkis $30,9 \pm 7,5$ kg/m²) neženkliai didesnis, palyginti su kitų grupių pacientėmis. Minėtoje grupėje vyravo I (FIGO) ligos stadija (83,33 proc.), esant vidutiniškai diferencijuotam (G2; 66,67 proc.) naviko lapsniui.

Taigi mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad imunohistocheminių reakcijų metu 94,12 proc. atvejų esant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumui nenustatyta bent vieno klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymo raiškos; dažniausiai (75,00 proc. atvejų) konstatuotas sutampantis MLH1/PMS2 baltymų raiškos trūkumas.

4.2.2. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2, MSH6, PMS2) raiškos analizė navikuose, kuriuose mikrosatelitų nestabilumas nustatytas naudojant žymenis BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59

Kaip jau buvo minėta, panaudojus naujai sukurtą *Promega Corporation* žymenų rinkinį mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas 30 iš 109 atvejų. Imunohistocheminiai tyrimai atlikti visais atvejais (n=30) ir jų rezultatai parodė, kad bent vieno baltymo (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) raiškos nenustatyta 22 iš 30 (73,33 proc.; 95 proc. PI 54,11–87,72) atvejų, o likusiais 8 iš 30 (26,67 proc.; 95 proc. PI 12,28–45,89) atvejų visų tirtų baltymų raiška buvo teigiama.

Minėtų baltymų raiška ir jos pasiskirstymas pateikti 20-oje lentelėje ir 18-ame paveiksle.

20 lentelė. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymas navikuose, kuriuose nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas (naviko histologinis tipas – endometrioidinė adenokarcinoma, n = 30)

Pacienčių amžius, metai	Naviko charakteristikos		Baltymo raiška			
	diferenciacijos laipsnis	FIGO stadija	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
71	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
72	G3	IB	nėra	nėra	yra	yra
72	G1	IA	nėra	nėra	yra	yra
63	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
61	G2	IIIA	nėra	nėra	yra	yra
58	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
80	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
66	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
68	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
61	G3	IA	nėra	nėra	yra	yra
74	G3	IA	nėra	nėra	yra	yra
53	G1	IA	nėra	nėra	yra	yra
51	G1	IA	nėra	nėra	yra	yra
70	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
74	G2	IB	nėra	nėra	yra	yra
67	G2	IA	nėra	nėra	yra	yra
63	G2	IIIC	nėra	nėra	nėra	nėra
52	G2	IB	yra	yra	nėra	nėra

Pacienčių amžius, metai	Naviko charakteristikos		Baltymo raiška			
	diferenciacijos laipsnis	FIGO stadija	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
73	G3	IB	yra	yra	yra	nėra
54	G1	IA	yra	yra	yra	nėra
53	G3	IIIC	yra	nėra	yra	yra
67	G3	IB	yra	nėra	yra	yra
61	G2	IVB	yra	yra	yra	yra
75	G2	IA	yra	yra	yra	yra
46	G2	IA	yra	yra	yra	yra
63	G1	IB	yra	yra	yra	yra
54	G1	IA	yra	yra	yra	yra
53	G2	IB	yra	yra	yra	yra
64	G3	IB	yra	yra	yra	yra
53	G1	IA	yra	yra	yra	yra

nėra – baltymo raiškos nėra; yra – baltymo raiška yra; G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; FIGO – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija; IA – navikas tik endometriume arba infiltravęs mažiau kaip pusę miometriumo; IB – navikas infiltravęs pusę arba daugiau kaip pusę miometriumo; IIIA – navikas infiltravęs gimdos kūno serozinį sluoksnį ir (ar) gimdos priklausinius; IIIC – yra metastazių dubens ir (ar) paraaortiniuose limfmazgiuose; IVB – yra tolimųjų metastazių.

Iš 20-oje lentelėje ir 18-ame paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad MLH1 baltymo raiškos nebuvo 17 atvejų (56,67 proc.; 95 proc. PI 37,43–74,54), PMS2 – 19 atvejų (63,33 proc.; 95 proc. PI 43,86–80,07), MSH6 – 4 atvejais (13,33 proc.; 95 proc. PI 3,76–30,72) ir MSH2 – 2 atvejais (6,67 proc.; 95 proc. PI 0,82–22,07) iš 30 atvejų.

Baltymas	Pacientės																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
MLH1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PMS2	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
MSH2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
MSH6	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Amžius, metai	71	72	72	63	61	58	80	66	68	61	74	53	51	70	74	67	63	52	73	54	53	67	61	75	46	63	54	53	64	53	
G	2	3	1	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	2	2	2	2	2	3	1	3	3	2	2	2	1	1	2	3	1	
FIGO stadija	IA	IB	IA	IA	IIIA	IB	IB	IB	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IB	IA	IIIC	IB	IB	IA	IIIC	IB	IVB	IA	IA	IB	IA	IB	IB	IA	

G – naviko diferenciacijos laipsnis; raudona spalva – baltymų raiškos nėra; žalia spalva – baltymų raiška yra.

18 pav. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymas gimdos kūno navikuose

21 lentelė. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymas atsižvelgiant į jų funkciją (n = 22)

Baltymo raiška		n (proc.)	95 proc. PI
MLH1	Nėra	17 (77,27)	54,63–92,18
PMS2			
MSH2	Nėra	2 (9,09)	1,12–29,16
MSH6			
MLH1	Yra	2 (9,09)	1,12–29,16
PMS2	Nėra		
MSH2	Yra	2 (9,09)	1,12–29,16
MSH6	Nėra		

n – atvejų skaičius; PI – pasikliautinis intervalas.

Iš 21-oje lentelėje ir 18-ame paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad dažniausiai, kaip ir pirmuoju atveju, nebuvo sutampančios MLH1/PMS2 baltymų raiškos – 17 iš 22 (77,27 proc.) atvejų, o kitos baltymų poros – MSH2/MSH6 raiškos nebuvo 2 iš 22 (9,09 proc.) atvejų. Po 2 iš 22 (9,09 proc.) atvejų nebuvo nustatyta vieno iš baltymų MSH6 ar PMS2 raiškos.

22-oje lentelėje pateikiame pacienčių ir navikų charakteristikas priklausomai nuo klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymo.

22 lentelė. Pacienčių pasiskirstymas atsižvelgiant į klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos sutrikimą (n = 22)

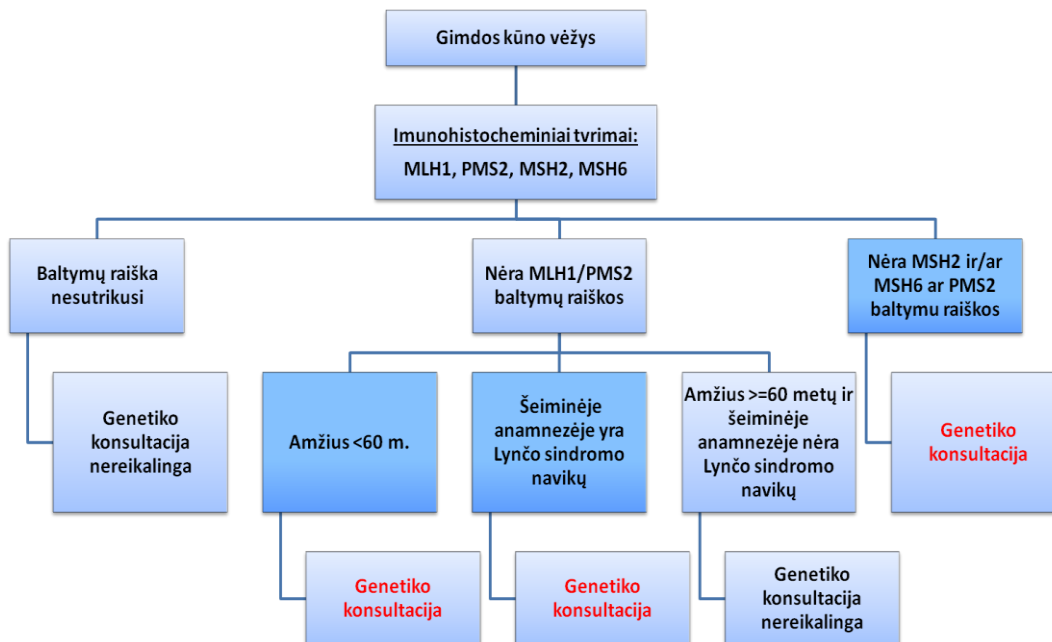
Charakteristikos	Nenustatyta dviejų baltymų raiškos n (proc.)		Nenustatyta vieno baltymo raiškos n (proc.)	
	MLH1- PSM2-	MSH2- MSH6-	PMS2- MLH1+	MSH6- MSH2+
Pacienčių skaičius	17 (77,27)	2* (9,09)	2 (9,09)	2 (9,09)
Amžiaus vidurkis (metai) ±SD	66±8	58±8	60±10	64±13
KMI vidurkis (kg/m ²) ±SD	30,5 ± 6,5	28,6 ± 1,8	25,3 ± 0,9	25,0 ± 5,2
Naviko histologinis tipas endometrioidinė adenokarcinoma	17 (100)	2 (100)	2(100)	2(100)
Diferenciacijos laipsnis				
G1	3 (17,65)	0	0	1(50,00)
G2	11 (64,71)	2 (100)	0	0
G3	3 (17,65)	0	2(100)	1(50,00)
FIGO stadija				
I	15 (88,24)	1(50,00)	1(50,00)	2(100)
II	0	0	0	0
III-IV	2 (11,76)	1(50,00)	1(50,00)	0

*vienu atveju nebuvo visų tirtų baltymų raiškos; n – atvejų skaičius; SD – standartinis nuokrypis; - baltymo raiškos nėra; + baltymo raiška yra; KMI – kūno masės indeksas.

Iš 22-oje lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad sutampantis MLH1/PSM2 baltymų raiškos trūkumas, kaip ir pirmuoju atveju, nustatytas vyresnio amžiaus pacientėms (amžiaus vidurkis – 66±8 m.), palyginti su kitų grupių pacienčių amžiumi. Minėtoje grupėje vyravo I (FIGO) ligos stadija (88,24 proc.) ir vidutiniškai diferencijuoti (G2; 64,71 proc.) navikai. Dėl per mažo atvejų skaičiaus statistiniai palyginimai tarp grupių nebuvo atlikti.

4.2.3. Pacienčių atranka gydytojui genetikui konsultuoti ir molekuliniams genetiniam tyrimams atlikti

Atrenkant pacientės dėl įtariamo Lynčo sindromo, buvo vadovautasi literatūroje pateiktais algoritmais (19 pav.), kuriuose pagrindinis dėmesys skiriamas pacientės amžiui diagnozės nustatymo metu, šeiminei anamnezei (Amsterdamo II klausimynas) ir klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškai.



19 pav. Rekomenduojamas algoritmas gydytojo genetikui konsultacijai gauti pacientėms, sergančioms gimdos kūno vėžiu (modifikuota pagal [25, 149])

Atsižvelgus į gautus rezultatus, 9 iš 30 tirtų pacienčių (30,0 proc.; 95 proc. PI 14,73–49,40) buvo rekomenduota gydytojo genetiko konsultacija. Jų charakteristikos pateiktos 20-ame paveiksle. Reikia pažymėti, kad grupėje, kurioje nebuvo MLH1/PMS2 baltymų raiškos (n=17), 14 pacienčių buvo vyresnės nei 60 metų amžiaus ir jų šeiminėje anamnezėje nebuvo Lynčo sindromui būdingų navikų. Matyt, šie endometrioidinės adenokarcinomos atvejai buvo sporadiniai ir pacientėms gydytojo genetiko konsultacija nebuvo rekomenduota. Trims minėtos grupės pacientėms, jaunesnėms nei 60 metų amžiaus, gydytojo genetiko konsultacija rekomenduota.

Baltymas	Pacientės								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MLH1									
PMS2									
MSH2									
MSH6									
Amžius, metai	58	53	51	53	67	63	52	54	73
G	G2	G1	G1	G3	G2	G2	G2	G1	G3
FIGO stadija	IB	IA	IA	IIIC	IB	IIIC	IA	IA	IB
Amsterdamo II kriterijai	ne	taip	taip	ne	ne	n.d.	ne	ne	ne

G – naviko diferenciacijos laipsnis; Amsterdamo II kriterijų klausimynas (bent vienas giminaitis sirgo su Lynčo sindromu susijusiais navikais: storosios žarnos, endometriumo, plonosios žarnos, šlapimtakių ar inkstų geldelių vėžiu): ne – neatitinka klausimyno kriterijų; taip – atitinka; n.d. – nėra duomenų; raudona spalva – baltymų raiškos nėra; žalia spalva – baltymų raiška yra.

20 pav. Pacienčių, kurios buvo konsultuotos gydytojo genetiko, charakteristikos

Iš 20-ame paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad 6 iš 9 pacienčių, kurios buvo konsultuotos gydytojo genetiko, neatitiko Amsterdamo II klausimyno kriterijų, t. y. jų šeimose nebuvo nė vieno nario, kuris būtų sirgęs Lynčo sindromui būdingais navikais. Dvi pacientės atitiko Amsterdamo II klausimyno kriterijus, kadangi jų šeimose buvo giminaičių, sirgusių Lynčo sindromo (abiem atvejais storosios žarnos) navikais, todėl joms pasiūlytas molekulinis genetinis ištyrimas dėl Lynčo sindromą lemiančių genų mutacijų. Viena tarp atrinktų genetikui konsultuoti pacienčių dėl savo šeiminės anamnezės, susijusios su Lynčo sindromo navikais, suteikti informacijos negalėjo, tačiau atsižvelgiant į tai, kad šiai 63 metų amžiaus pacientei, sergančiai IIIC (FIGO) ligos stadijos endometrioidine adenokarcinoma, nenustatyta visų tirtų baltymų raiškos, jai taip pat pasiūlyta atlikti molekulinį genetinį ištyrimą.

Taigi mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad 3 iš 109 (2,75 proc.; 95 proc. PI 0,57–7,83) į tyrimą įtrauktų pacienčių buvo pasiūlyta atlikti molekulinį genetinį ištyrimą dėl Lynčo sindromą lemiančių genų mutacijų.

4.3. Mikrosatelitų nestabilumo įtaka pacienčių išgyvenamumui

Pacientės tyrimo metu vidutiniškai stebėtos 40,4 mėnesių (nuo 5,2 iki 47,9 mėn.), todėl buvo analizuotas 3-jų metų išgyvenamumas. Gimdos kūno vėžiu sirgusių pacienčių išgyvenamumo priklausomybė nuo amžiaus ir klinikinių-patologinių veiksnių pateikiama 21–26 paveiksluose, o 3-jų metų išgyvenamumo analizės rezultatai – 23-oje lentelėje.

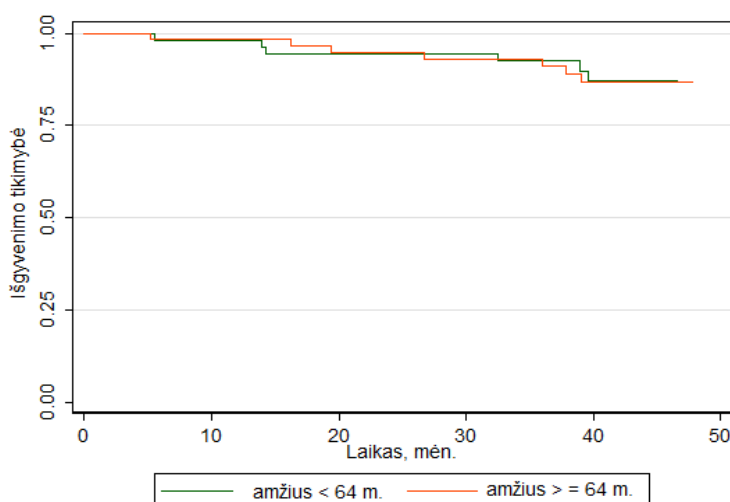
23 lentelė. Pacienčių, sergančių gimdos kūno vėžiu, išgyvenamumas (n=109)

Charakteristikos	3-ju metų išgyvenamumas, proc.	95 proc. PI
Amžius, metai		
< 64	92,45	81,13–97,10
≥ 64	90,96	79,63–96,14
FIGO stadija		
IA	96,83	89,90–99,20
IB	92,00	71,64–97,94
II-IV	75,89	51,39–89,20
Naviko diferenciacijos laipsnis		
G1	100,0	–
G2	95,87	84,46–98,95
G3	64,29	34,33–83,31
Gx	50,00	5,78–84,49
Naviko histologinis tipas		
endometrioidinė adenokarcinoma	95,93	89,52–98,46
kiti tipai*	44,44	13,59–71,93
Gydymas		
chirurginis	97,06	88,75–99,26
chirurginis ir spindulinis	82,25	64,68–91,61
chirurginis ir chemoterapinis	85,71	33,41– 97,86
Mikrosatelitų nestabilumas MSS	90,15	81,92–94,75

Charakteristikos	3-jų metų išgyvenamumas, proc.	95 proc. PI
MSI-H	100,0	–

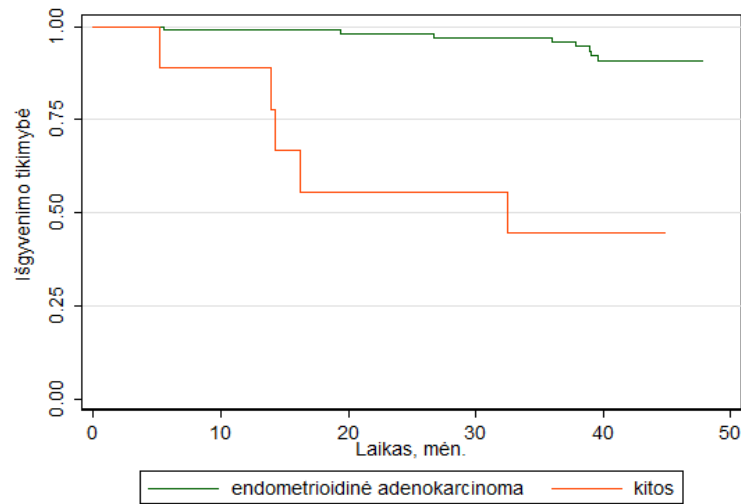
kiti tipai* – serozinė adenokarcinoma, šviesiųjų ląstelių karcinoma, adenosarkoma; PI – pasikliautinas intervalas; MSS – mikrosatelitų stabilumas; MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; Gx – naviko diferenciacijos laipsnio neįmanoma įvertinti.

Mūsų tyrtoje gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių grupėje amžius neturėjo reikšmingos įtakos pacienčių išgyvenamumui (21 pav.).



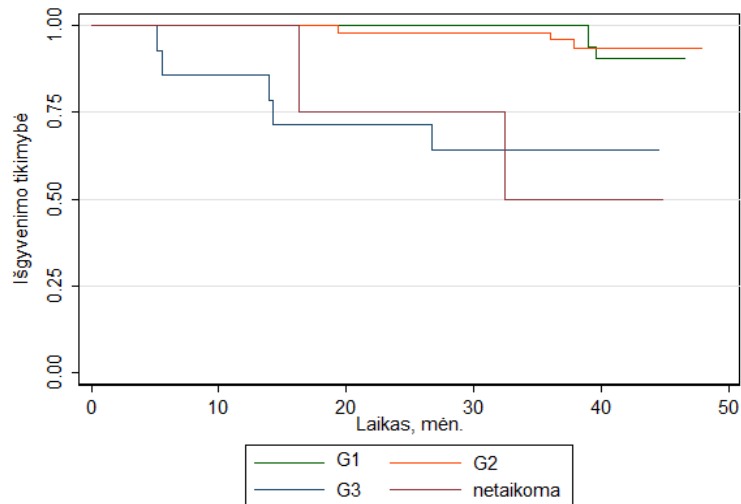
21 pav. Gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumas priklausomai nuo amžiaus ($p=0,921$)

Pacienčių išgyvenamumas priklausė nuo klinikinių-patologinių charakteristikų. Daugumai pacienčių ($n=100$) histologiškai diagnozuota endometrioidinė adenokarcinoma ir jų išgyvenamumas buvo ženkliai geresnis nei esant kitoms histologinėms naviko formoms (22 pav.). 3-jų metų išgyvenamumas atitinkamai buvo 95,93 proc. ir 44,44 proc. (23 lent.).



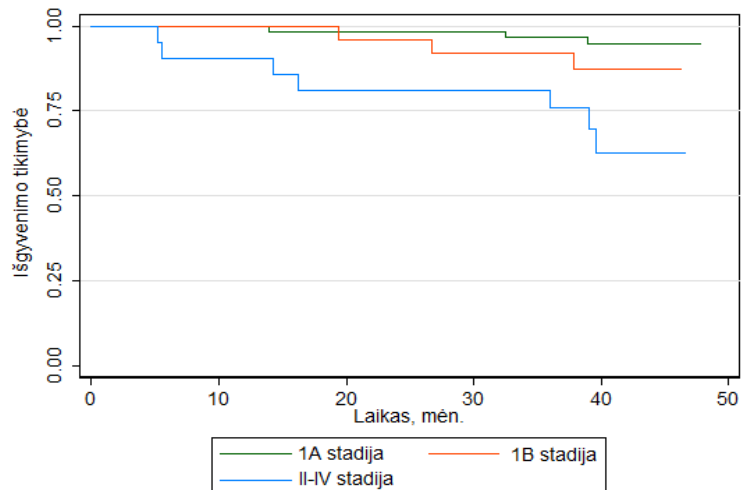
22 pav. Gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumas priklausomai nuo naviko histologinio tipo ($p < 0,0001$)

Išgyvenamumas statistiškai reikšmingai priklausė ir nuo naviko diferenciacijos laipsnio – esant gerai (G1) ir vidutiniškai (G2) diferencijuotam navikui išgyvenamumo rezultatai buvo geresni, palyginti su pacienčių išgyvenamumu esant blogai (G3) diferencijuotam navikui (23 pav.). Esant gerai ir vidutiniškai diferencijuotam navikui 3-jų metų išgyvenamumas buvo didesnis nei 95 proc. (23 lent.).



23 pav. Gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumas priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio ($p=0,0001$)

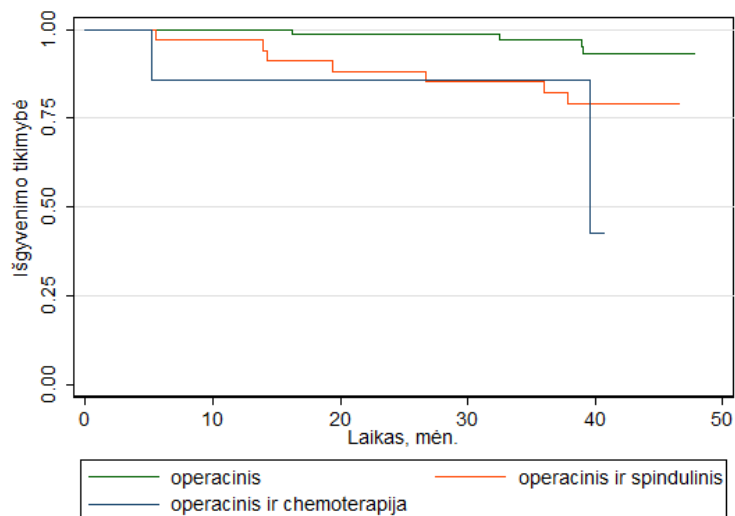
Ligos stadija buvo reikšmingas išgyvenamumui darantis įtaką veiksnys: pacienčių, kurioms diagnozuotas neišplitęs už gimdos kūno ribų navikas (IA-IB FIGO ligos stadijos), išgyvenamumas buvo geresnis negu pacienčių, kurioms diagnozuotas lokalus arba regioninis naviko išplitimas (II-IV FIGO ligos stadijos) (24 pav.). IA ir IB stadijos liga sirgusių pacienčių 3-jų metų išgyvenamumo rodikliai viršijo 90 proc. (23 lent.).



24 pav. Gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumas priklausomai nuo ligos stadijos ($p=0,001$)

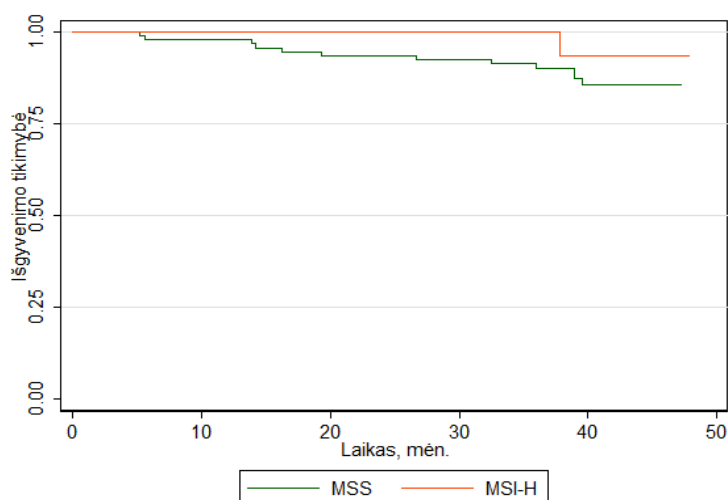
Kaip jau buvo minėta, visoms ($n=109$) į tyrimą įtrauktoms pacientėms buvo taikytas chirurginis gydymas, o daliai iš jų ($n=37$), priklausomai nuo ligos stadijos ir naviko diferenciacijos laipsnio pagal patvirtintus Vilniaus universiteto Onkologijos instituto gydymo standartus – pooperacinis spindulinis gydymas: suderintas spindulinis ($n=16$); brachiterapija ($n=21$) ir tik keturioms pacientėms ($n=4$), kurioms diagnozuotas regioninis ligos išplitimas (IVB FIGO ligos stadija), buvo taikyta pooperacinė chemoterapija.

Pacienčių, kurioms gydyti buvo atliktas tik chirurginis gydymas išgyvenamumas buvo reikšmingai geresnis nei tų, kurioms gydyti buvo taikytas pooperacinis spindulinis gydymas ar chemoterapija (25 pav.). Reikia pažymėti, kad daugumai pacienčių (65 iš 68), kurioms buvo atliktas tik chirurginis gydymas, diagnozuota ankstyvosios (IA-IB) stadijos liga ir jų 3-jų metų išgyvenamumas buvo 97,06 proc. (23 lent.).



25 pav. Gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumas priklausomai nuo taikyto gydymo ($p=0,031$)

Mūsų tyrimo duomenimis, statistiškai reikšmingos sąsajos tarp pacienčių išgyvenamumo ir mikrosatelitų būklės nebuvo, tačiau reikia pažymėti, kad pacienčių išgyvenamumas esant mikrosatelitų stabiliam fenotipui buvo blogesnis nei esant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumui (26 pav.)



MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas.

26 pav. Gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumas priklausomai nuo mikrosatelitų būklės ($p=0,431$)

Daugiaveiksni analizė buvo atlikta siekiant nustatyti klinikinių-patologinių parametrų ir jų tarpusavio sąveikos reikšmę pacienčių išgyvenamumui (24 lent.). Į daugiaveiksni analizės modelį įtraukti tik tie veiksniai, kurie buvo reikšmingi vienaveiksnei analizei, bei mikrosatelitų nestabilumas. Gauti analizės rezultatai parodė, kad mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nebuvo susijęs su gimdos kūno vėžiu sergančių pacienčių išgyvenamumu ($p=0,433$).

24 lentelė. Pacienčių, sergančių gimdos kūno vėžiu, daugiaveiksnių analizės rezultatai

Charakteristikos	Santykinė rizika	95 proc. PI	<i>p</i>
FIGO stadija			
IA	1,00*	–	–
IB	2,25	0,24–21,03	0,483
II-IV	4,94	0,60–40,60	0,140
Naviko diferenciacijos laipsnis			
G1	1,00*	–	–
G2	0,85	0,14–5,14	0,864
G3	3,88	0,73–20,51	0,112
Gx	1,46	0,17–12,56	0,354
Naviko histologinis tipas			
endometrioidinė adenokarcinoma	1,00*	–	–
kiti tipai**	4,13	0,60–40,60	0,111
Gydymas			
chirurginis	1,00*	–	–
chirurginis ir spindulinis	0,88	0,12–6,40	0,884
chirurginis ir chemoterapija	1,26	0,10–16,65	0,100
Mikrosatelitų nestabilumas			
MSS	1,00*	–	–
MSI-H	0,41	0,05–3,69	0,433

* – palyginamoji grupė; kiti tipai** – serozinė adenokarcinoma, šviesiųjų ląstelių karcinoma, adenosarkoma; PI – pasikliautinis intervalas; MSS - mikrosatelitų stabilumas; MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; Gx – naviko diferenciacijos laipsnio neįmanoma įvertinti.

Daugiaveiksnių analizės rezultatai parodė, kad mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nebuvo susijęs su gimdos kūno vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumu ($p=0,433$), o pacientų išgyvenamumui reikšmingos įtakos turėjo ligos stadija ir naviko histologinis tipas (25 lent.).

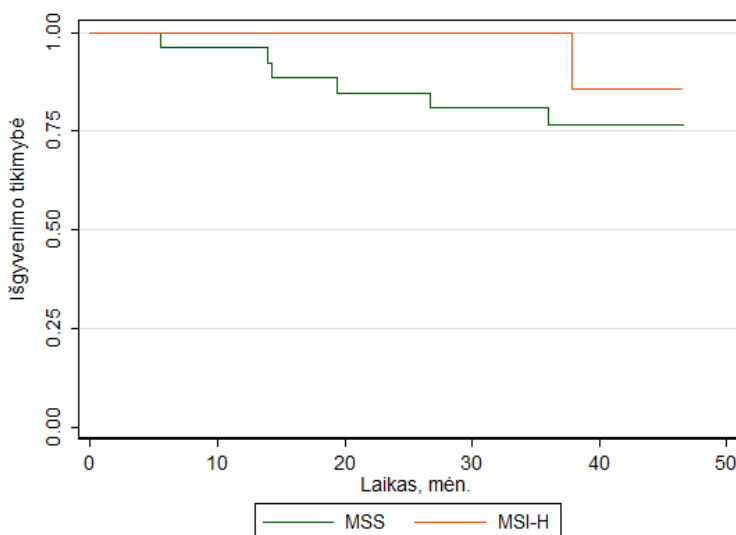
25 lentelė. Veiksniai, turintys reikšmingos įtakos pacientų, sergančių gimdos kūno vėžiu, išgyvenamumui

Charakteristikos	Santykinė rizika	95 proc. PI	<i>p</i>
FIGO stadija			
IA	1,00*	–	–
IB	2,50	0,50–12,43	0,264
II-IV	5,19	1,24–20,74	0,022***
Naviko histologinis tipas			
endometrioidinė adenokarcinoma	1,00*	–	–
kiti tipai**	6,18	1,84–20,74	0,003***

*– palyginamoji grupė; kiti tipai**– serozinė adenokarcinoma, šviesiųjų ląstelių karcinoma, adenosarkoma; PI – pasikliautinis intervalas; *** – statistiškai reikšmingas skirtumas.

Kadangi literatūroje yra pavienių duomenų apie mikrosatelitų nestabilumo įtaką išgyvenamumui pacientų, kurioms gydyti buvo taikomas pooperacinis spindulinis gydymas, todėl pateikiame šios grupės išgyvenamumo analizę (27

pav.). Nors reikšmingų išgyvenamumo skirtumų tarp pacienčių, kurių gydymui buvo taikytas ar netaikytas pooperacinis spindulinis gydymas, ir mikrosatelitų būklės nenustatyta, tačiau pacienčių išgyvenamumas esant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumui buvo geresnis nei esant mikrosatelitų stabiliam fenotipui. Trejus metus MSI-H grupėje išgyveno visos pacientės, o MSS grupėje – 76,73 proc. (95 proc. PI 55,35–88,82) pacienčių.



MSI-H – mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; MSS – mikrosatelitų stabilumas.

27 pav. Pacienčių, kurioms gydyti buvo taikomas spindulinis gydymas (n=37), išgyvenamumas priklausomai nuo mikrosatelitų būklės ($p=0,492$)

Taigi, mūsų tyrimo duomenimis, nenustatyta statistiškai reikšmingos sąsajos tarp sergančiųjų gimdos kūno vėžiu išgyvenamumo ir mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo. Reikia pažymėti, kad analizavome tik 3-jų metų išgyvenamumą, todėl pacienčių stebėseną reikia tęsti, ypač atkreipiant dėmesį į galimą mikrosatelitų nestabilumo predikcinę svarbą spindulinės terapijos požiūriu.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Mikrosatelitų nestabilumo fenotipas ir klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos genų mutacijos, kaip jau buvo minėta, pirmą kartą aprašyti 1993 metais tiriant paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio (Lynčo sindromo) atvejus [10]. Tolesni mikrosatelitų nestabilumo fenotipo tyrimai parodė, kad mikrosatelitų nestabilumas nustatomas ir kitų lokalizacijų, susijusių su Lynčo sindromu, navikuose (dažniausiai gimdos kūno), taip pat ir sporadiniuose, dažniausiai – storosios žarnos ir gimdos kūno navikuose [87, 150]. Lynčo sindromo atveju mikrosatelitų nestabilumą navikuose sukelia klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos genų (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) mutacijos [90, 91], o sporadiniuose navikuose mikrosatelitų nestabilumą, matyt, sąlygoja epigenetiniai mechanizmai, pavyzdžiui, *MLH1* geno išveiklinimas dėl promotoriaus hipermetilinimo [26].

Daugiausia duomenų apie mikrosatelitų nestabilumo svarbą klinikinei praktikai sukaupta Lynčo sindromo atveju. Mikrosatelitų nestabilumo tyrimas kaip testas, naudojant JAV nacionalinio vėžio instituto pasiūlytus žymenis, yra diegiamas į klinikinę praktiką, atliekant patikrą dėl paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio. Didelės imties tyrimai, skirti nustatyti sąsajai tarp mikrosatelitų nestabilumo ir sergančiųjų storosios žarnos vėžiu išgyvenamumo, parodė, kad navikuose, esant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumui, ligos prognozė yra geresnė [151]. Nors dar trūksta didelės imties perspektyvinių tyrimų, įrodančių mikrosatelitų nestabilumo predikcinę vertę, Europos onkologų chemoterapeutų draugija (ESMO; angl. *European Society for Medical Oncology*) rekomenduoja, prieš skiriant fluoropirimidino monoterapiją, įvertinti mikrosatelitų nestabilumą.

Apie mikrosatelitų nestabilumo svarbą klinikinei praktikai sergant onkoginekologinėmis ligomis duomenų sukaupta nedaug. Pavienių tyrimų duomenimis, gimdos kaklelio vėžiu sergančių pacienčių, kurioms nustatytas

mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas, išgyvenamumas buvo blogesnis, palyginti su išgyvenamumu tų pacienčių, kurioms mikrosatelitų nestabilumo nebuvo konstatuota [64]. Šio tyrimo duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas gali būti susijęs su naviko progresija ir, matyt, blogesne gimdos kaklelio vėžio prognoze. Kaip jau buvo minėta, apie mikrosatelitų nestabilumo svarbą klinikinei praktikai sergant gimdos kūno vėžiu duomenų sukaupta nedaug. Dėl šio žymens prognozinės vertės duomenys yra priešaringi. Remiantis mūsų gautais duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas nebuvo reikšmingas prognozinis pacienčių išgyvenamumo veiksnys sergant gimdos kūno vėžiu. Tai, kad tyrėjai gauna priešaringus rezultatus, rodo, kad šio pobūdžio tyrimus reikia tęsti įtraukiant didesnę pacienčių skaičių, kadangi tiek mūsų tyrimo, tiek kitų tyrėjų atliktų tyrimų imtis buvo nepakankama siekiant objektyviai įvertinti mikrosatelitų nestabilumo kaip prognozinio žymens svarbą. Juolab, kad *J. Karamurzin* ir bendraautorių [86] duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas yra vienas iš molekulinų žymenų, susijusių su endometrioidinio tipo gimdos kūno vėžiu, kurio prognozė, palyginti su kitų histologinių tipų gimdos kūno vėžiu, yra geresnė.

Mažai žinoma ir apie mikrosatelitų nestabilumo kaip predikcinio žymens svarbą sergant onkoginekologinėmis ligomis. Viena vertus, rezultatai pavienių tyrimų, kurių metu buvo vertinama sąsaja tarp mikrosatelitų nestabilumo ir atsako į chemoterapiją gimdos kaklelio vėžio atveju, tokios sąsajos neparodė [65], antra vertus, *C. Bilbao* ir bendraautorių [152] preliminariais duomenimis, mikrosatelitų nestabilumas gali daryti įtaką atsakui į spindulinę terapiją sergant ankstyvųjų stadijų endometrioidine adenokarcinoma. Mūsų atveju, matyt, dėl mažos tyrimo imties mikrosatelitų nestabilumas gydymo atsakui įtakos neturėjo.

Daugiau duomenų, palyginti su duomenimis, gautais vertinant mikrosatelitų nestabilumą prognozinio ir predikcinio aspektu sergant onkoginekologinėmis ligomis, sukaupta apie mikrosatelitų nestabilumo sąsają su klinikinėmis-

patologinėmis charakteristikomis, kas svarbu numatant ligos eigą ir parenkant adekvatų gydymą.

Nevienareikšmiai duomenys gauti tyrinėjant sąsają tarp mikrosatelitų nestabilumo ir klinikinių-patologinių charakteristikų, pavyzdžiui, pacienčių amžiaus, kūno masės indekso, naviko histologinio tipo, naviko diferenciacijos laipsnio, ligos stadijos ir kt.

Kiaušidžių vėžio atvejais mikrosatelitų nestabilumo dažnis svyruoja nuo 8 iki 16 proc. [59]. Vienų autorių duomenimis, nustatyta sąsaja tarp mikrosatelitų nestabilumo ir blogos diferenciacijos kiaušidžių adenokarcinomos bei tarp klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos sutrikimo ir serozinio kiaušidžių vėžio histologinio tipo [55, 57]. Kitų tyrėjų duomenimis, nenustatyta statistiškai reikšmingos sąsajos tarp mikrosatelitų nestabilumo ir klinikinių-patologinių veiksnių, tokių kaip naviko histologinis tipas, ligos stadija [59]. Gimdos kaklelio vėžio atveju taip pat nenustatyta statistiškai reikšmingos sąsajos tarp mikrosatelitų nestabilumo ir naviko diferenciacijos laipsnio, ligos stadijos bei pacienčių amžiaus [63], nors mikrosatelitų nestabilumas sergant gimdos kaklelio vėžiu siekia 25 proc. [62].

Esant sporadiniam gimdos kūno vėžiui, mikrosatelitų nestabilumas svyruoja nuo 20 iki 30 proc. [86], o paveldimo vėžio, susijusio su Lynčo sindromu – 2–4 proc. [148]. Mūsų tyrime mikrosatelitų nestabilumui nustatyti naudotas *Promega Corporation* penkių žymenų – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27 rinkinys. Ištyrus 109 pacientes, sergančias gimdos kūno vėžiu, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas (≥ 2 žymenys iš 5) nustatytas 15,6 proc. atvejų (17 iš 109 pacienčių). Reikia pažymėti, kad visais 17 atvejų mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas endometrioidinio tipo adenokarcinomose ir jo nerasta esant neendometrioidinio tipo karcinomoms. Panašius rezultatus paskelbė ir kiti tyrėjai – mikrosatelitų nestabilumas buvo dažniau nustatomas endometrioidinio tipo adenokarcinomose, palyginti su neendometrioidinio tipo karcinomomis [12,

86]. Ir mūsų, ir anksčiau paskelbtų tyrimų duomenys rodo, kad mikrosatelitų nestabilumas nėra reikšmingas daugelio neendometrioidinio tipo karcinomų atvejais, tačiau svarbus endometrioidinio tipo adenokarcinomų atvejais.

Mūsų tyrime sąsaja tarp klinikinių-patologinių parametrų ir mikrosatelitų nestabilumo buvo analizuota tik endometrioidinio tipo adenokarcinomų atvejais (n=100). Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp grupių (MSI-H ir MSS) priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio ir naviko invazijos į miometriumą gylio. Ši sąsaja nustatyta ir kitų tyrėjų [12, 142]. Reikia pažymėti, kad mūsų tyrimo duomenimis (nors rezultatai, matyt, dėl mažos imties nebuvo statistiškai reikšmingi), tikėtina sąsaja tarp mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo ir vėlyvesnės ligos stadijos. Yra žinoma, kad gilesnė naviko invazija į miometriumą, blogesnis naviko diferenciacijos laipsnis bei vėlyvesnė ligos stadija – tai prognoziniai žymenys, kurie rodo dažnesnę recidyvų tikimybę ir blogesnio išgyvenamumo prognozę sergant gimdos kūno vėžiu. Todėl galima daryti prielaidą, kad mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas yra nepalankus prognozinis žymuo esant sporadinei endometrioidinei adenokarcinomai. Kita vertus, paskelbta darbu, kuriuose nenustatyta sąsajos tarp mikrosatelitų nestabilumo ir naviko diferenciacijos laipsnio, naviko invazijos į miometriumą ir ligos stadijos [142, 153]. Kitaip nei storosios žarnos vėžio atvejais, negalima teigti, kad mikrosatelitų nestabilumo fenotipas yra nepriklausomas prognozinis veiksnys esant sporadinei endometrioidinio tipo adenokarcinomai. Todėl būtina tęsti mokslinius tyrimus įtraukiant į juos kuo daugiau pacientų bei išplečiant žymenų spektrą mikrosatelitų nestabilumui nustatyti.

Svarbiausias veiksnys, kuris lemia mikrosatelitų nestabilumą, yra klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos sutrikimas. Šioje sistemoje identifikuoti keturi pagrindiniai baltymai – MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, kuriems būdinga savita raiška. Kaip jau buvo minėta, mūsų tyrime klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MLH2,

MSH6 ir PMS2) raiškos navikuose tyrimai atlikti tik tais atvejais, jei juose konstatuotas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas. Imunohistocheminių tyrimų rezultatai parodė, kad klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos bent vieno baltymo raiškos sutrikimas nustatytas 94,1 proc. panaudojus mikrosatelitų nestabilumui nustatyti žymenų rinkinį – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27. Dažniausiai, tai yra 75 proc. atvejų nenustatyta sutampanti MLH1/PMS2 baltymų raiška, o sutampanti kitos iš dviejų būtinų baltymų poros – MSH2/MSH6 raiška nenustatyta tik 6,2 proc. atvejų. Panašius duomenis paskelbė ir kiti tyrėjai. Pavyzdžiui, *L.M. Peterson* ir bendraautorių duomenimis [154], baltymų raiškos nebuvo 94 proc. tirtų atvejų, kai navikuose nustatytas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas; kituose tyrimuose – 69 proc., jei tirta tik MLH1 ir MSH2 baltymų raiška. Tyrimo jautrumas padidėjo iki 91 proc., papildomai ištyrus PMS2 ir MSH6 baltymų raišką [155].

Išanalizavus mūsų gautus duomenis, reikia pažymėti, kad daugumoje atvejų (94,1 proc.) mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas koreliuoja su klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos sutrikimu, t.y. sistema nefunkcionuoja, jei trūksta bent vieno baltymo raiškos. Tarp 16 atvejų, kai nenustatyta bent vieno baltymo raiškos, vienu atveju nenustatyta visų tirtų baltymų (MLH1, MSH2, MSH6 ir PMS2) raiškos. Tai rodo, kad minėtoje sistemoje esant pažaidų ji nėra aktyvinama, dėl to pažaidos nėra ištaisomos ir joms kaupiantis galimybė navikiniam procesui vystytis yra didesnė. Pažymėtinas ir kitas mūsų stebėtas atvejis, kai, esant mikrosatelitų nestabilumui, visų tirtų baltymų raiška buvo teigiama. Šio atvejo rezultatus galėjo lemti ir tai, kad buvo tiriama tik keturių pagrindinių klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MSH2, MSH6 ir PMS2) raiška, bet nebuvo tiriama kitų baltymų, pavyzdžiui, PMS1, MSH3 ir kitų, kurie taip pat dalyvauja šioje sistemoje, raiška. Matyt, vien klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos tyrimo nepakanka siekiant išsiaiškinti

predispoziciją vėžiui atsirasti ir vystytis. *B. Halvarsson* ir bendraautorių [156] nuomone, vertinant genomo nestabilumą nepakanka pasikliauti vien imunohistocheminės analizės rezultatais. Tokiais atvejais reikėtų taikyti ir kitus genomo nestabilumo vertinimo metodus.

Mikrosatelitų nestabilumui nustatyti naudojami įvairūs tyrimo metodai, kurių esmė – aptikti genominius pokyčius pasirinktose genomo srityse, lyginant skirtingus tiriamojo paciento audinius (naviko ir sveiką audinį). 1998 metais JAV nacionalinis vėžio institutas storosios žarnos vėžio atveju pasiūlė tirti penkias genomo sritis ir naudoti penkių žymenų rinkinį, kurį sudaro trys dviejų nukleotidų žymenys – D2S123, D5S346, D17S250 ir du vieno nukleotido žymenys – BAT25 ir BAT26 [14]. Įvairių kompanijų gamintojai pateikia rinkai ir kitokių žymenų rinkinius. Todėl, tiriant mikrosatelitų nestabilumą, gali būti naudojama ir daugiau žymenų. Be to, nuolat kuriami patikimesni bei jautresni žymenys, kuriuos siūloma naudoti kitų lokalizacijų, t.y. ne storosios žarnos navikų mikrosatelitų nestabilumui nustatyti. Siekiant padidinti JAV nacionalinio vėžio instituto rekomenduojamų žymenų jautrumą bei specifiškumą, ypač kitų, ne storosios žarnos lokalizacijų navikų mikrosatelitų nestabilumo tyrimams, *Promega Corporation* (JAV) pasiūlė naudoti penkių vieno nukleotido žymenų – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27 bei dviejų penkių nukleotidų žymenų – Penta C ir Penta D (pastarieji naudojami kaip pavyzdžio identifikacijos kontrolė) rinkinį. Atliktų tyrimų duomenimis [15, 16], vieno nukleotido žymenys yra jautresni ir specifiškesni, palyginti su dviejų nukleotidų žymenimis nustatant mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo fenotipą navikuose. Minėtas *Promega Corporation* penkių žymenų – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27 rinkinys buvo naudojamas ir mūsų darbe.

Atsižvelgiant į tai, jog pasikartojantys mononukleotidai ir ypač ilgosios poliA sekos yra nestabilios genomo sritys, pasižyminčios dažnesnėmis mutacijomis neveiklios klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo

sistemos ląstelėse, šių pasikartojančių mononukleotidų sričių panaudojimas suteikia potencialų pranašumą, palyginti su jau naudojamais mikrosatelitų nestabilumui nustatyti žymenimis, įvairių lokalizacijų (ne storosios žarnos), tarp jų ir gimdos kūno navikų, atvejais. Taigi, remiantis šia hipoteze, *Promega Corporation* sukūrė naują žymenų – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59 rinkinį, kuris taip pat buvo naudojamas mūsų darbe.

Pastarasis žymenų rinkinys tiriamas keliuose JAV centruose bei Lietuvoje. Šiame darbe pateikiame tik Vilniaus universiteto Onkologijos institute (dabar Nacionalinis vėžio institutas) gautus duomenis. Šie rezultatai, gauti panaudojus naujai sukurtą *Promega Corporation* žymenų – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59 rinkinį parodė, kad mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo nustatymo tikslumas padidėjo iki 2 kartų, palyginti su anksčiau minėtu žymenų – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ir MONO-27 rinkinio tikslumu. Ištyrus 109 pacientes, sergančias gimdos kūno vėžiu, panaudojus pirmąjį žymenų rinkinį, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas 15,6 proc. atvejų (17 iš 109 pacienčių), o panaudojus antrąjį žymenų rinkinį – 27,5 proc. atvejų (30 iš 109 pacienčių).

Kaip jau buvo minėta, imunohistocheminiai klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažeidimų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MSH2, MSH6 ir PMS2) raiškos tyrimai atlikti tik tuose navikuose, kuriuose konstatuotas mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas. Navikų, kuriuose mikrosatelitų nestabilumas buvo nustatytas naudojant pirmąjį *Promega Corporation* žymenų rinkinį, imunohistocheminių tyrimų rezultatai parodė, kad 94,1 proc. atvejų (16 iš 17 pacienčių) aptiktas bent vieno baltymo raiškos sutrikimas ir tik 5,9 proc. atvejų (1 iš 17 pacienčių) visų baltymų raiška buvo teigiama. Kai mikrosatelitų nestabilumui nustatyti buvo naudotas naujai sukurtas *Promega Corporation* žymenų rinkinys, bent vieno minėto baltymo raiškos trūkumas nustatytas 77,3 proc. atvejų (22 iš 30 pacienčių) ir net 8 iš 30 pacienčių (26,7 proc. atvejų) visų baltymų raiška buvo teigiama (28

pav.). Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad naujieji žymenys padeda tiksliau nustatyti ne tik mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumą gimdos kūno navikuose, bet ir tiksliau parodo DNR pažeidimų taisymo sistemos neveiklumą, todėl, matyt, genomo nestabilumui vertinti reikalingi abu (molekuliniai ir imunohistocheminiai) tyrimo metodai.

MMR baltymai	Pacientės																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
MLH1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green
PMS2	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green
MSH2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
MSH6	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
I rinkinys	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange
II rinkinys	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	
Amžius, metai	71	72	72	63	61	58	80	66	68	61	74	63	73	54	53	67	61	75	46	63	54	53	64	53	53	51	70	74	67	52	
Genetiko konsultacija					X							X	X	X	X	X										X	X			X	

MMR baltymai – klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymai; I rinkinys – BAT-25, BAT-26, Nr-21, NR-24 ir MONO-27; II rinkinys – BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57 ir BAT-59; raudona spalva – baltymų raiškos nėra; žalia spalva – baltymų raiška yra; ruda spalva – I rinkiniu navikuose nustatytas mikrosatelitų stabilumas; geltona spalva – I rinkiniu navikuose nustatytas mikrosatelitų mažo dažnio nestabilumas; X – pacientei rekomenduota gydytojo genetiko konsultacija.

28 pav. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos baltymų raiškos pasiskirstymas gimdos kūno navikuose

Remiantis molekulinį/imunohistocheminių mikrosatelitų nestabilumo tyrimų analize, galima atrinkti pacientės gydytojui genetikui konsultuoti ir atlikti molekulinis genetinius tyrimus įtariant paveldimą gimdos kūno vėžį (Lynčo sindromą). Taigi ir mūsų tyrimo metu gydytojui genetikui konsultuoti pavyko atrinkti 9 iš 109 (8,3 proc.) į tyrimą įtrauktų pacienčių, iš kurių, reikia pažymėti, 3 pacientės papildomai buvo atrinktos remiantis mikrosatelitų nestabilumo tyrimų rezultatais, naudojant naują žymenų rinkinį. Po gydytojo genetiko konsultacijos 3 pacientėms pasiūlytas molekulinis genetinis ištyrimas dėl Lynčo sindromą lemiančių genų mutacijų.

Kadangi mūsų darbas atliktas glaudžiai bendradarbiaujant su *Promega Corporation* ir Viskonsino universitetu (Madisonas, JAV) bei Pietų Kalifornijos universitetu (Los Andželas, JAV), naujojo žymenų rinkinio diegimo į klinikinę praktiką galimybės paaiškės apibendrinus visų centrų gautus tyrimų duomenis. Ateityje mikrosatelitų nestabilumo tyrimus su naujai sukurtu žymenų rinkiniu reikalinga tęsti siekiant juos pritaikyti ne tik gimdos kūno, bet ir kitų (ne storosios žarnos) lokalizacijų navikų atvejais, taip pat ir ankstyvųjų ikivėžinių ligų (pvz., storosios žarnos polipų, endometriumo hiperplazijos ir kt.) diagnostikoje.

6. IŠVADOS

1. Ištyrus 109 sergančiąsias gimdos kūno vėžiu, mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas 15,6 proc. pacienčių naudojant *Promega Corporation* (JAV) žymenų rinkinį – BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27, ir 27,5 proc. – naudojant naująjį BAT-52, BAT-55, BAT-56, BAT-57, BAT-59 žymenų rinkinį.

2. Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas nustatytas tik endometrioidinės adenokarcinomos atvejais; statistiškai reikšmingi skirtumai konstatuoti tarp mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumo ir stabilaus fenotipo priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio bei invazijos į miometriumą gylio. Mikrosatelitų didelio dažnio nestabilumas dažniau nustatytas blogesnės diferenciacijos navikuose ir esant gilesnei naviko invazijai į miometriumą.

3. Klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos bent vieno baltymo raiškos sutrikimas nustatytas 94,1 proc. atvejų, kai mikrosatelitų nestabilumo analizei naudotas pirmasis žymenų rinkinys ir 73,3 proc. atvejų – kai naudotas antrasis (naujas) žymenų rinkinys. Dažniausiai konstatuotas MLH1/PMS2 baltymų raiškos sutrikimas.

4. Sergančiųjų gimdos kūno vėžiu išgyvenamumas nebuvo statistiškai reikšmingai susijęs su mikrosatelitų nestabilumu.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Lietuvoje, vadovaujantis kitų šalių patyrimu, pavyzdžiui, Nyderlandų, JAV, o taip pat įvairių tarptautinių organizacijų rekomendacijomis [81, 98, 100, 157], tikslinga parengti rekomendacijas dėl mikrosatelitų nestabilumo tyrimų įdiegimo į praktiką esant gimdos kūno vėžiui, kaip ir paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio (Lynčo sindromo) atvejais.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63:11-30.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
3. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Žiūrėta: 2014-05-30. Prieiga per internetą: [<http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>].
4. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15:23-34.
5. Vilniaus universiteto Onkologijos institutas. Vėžys Lietuvoje 2010 m. (Cancer in Lithuania, 2010). Vilnius, 2013.
6. Gilmore S, Peakall R, Robertson J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Sci Int* 2003; 131:65-74.
7. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5:435-45.
8. Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84:27-47.
9. Lynch HT, Lynch JF. The Lynch syndromes. *Curr Opin Oncol* 1993; 5:687-96.
10. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53:5853-5.

11. Meyer LA, Broaddus RR, Lu KH. Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. *Cancer Control* 2009; 16:14-22.
12. An HJ, Kim KI, Kim JY, Shim JY, Kang H, Kim TH, et al. Microsatellite instability in endometrioid type endometrial adenocarcinoma is associated with poor prognostic indicators. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:846-53.
13. MacDonald ND, Salvesen HB, Ryan A, Iversen OE, Akslen LA, Jacobs IJ. Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer Res* 2000; 60:1750-2.
14. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-57.
15. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn* 2006; 8:305-11.
16. Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Buhard O, et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis* 2006; 27:951-5.
17. Bacher J. GI, Albrecht D., Weiss J., Sievers c., Richie K., Agni R., Reichejderfer M., Vidugiriene J., Kanopiene D. New Markers for improved detection of MSI in early and extra-colonic tumors. *J Mol Diagn* 2013; 15(6):916.
18. Bennett P. Microsatellites. *Mol Pathol* 2000; 53:177-83.
19. King DG. Evolution of simple sequence repeats as mutable sites. *Adv Exp Med Biol* 2012; 769:10-25.

20. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29:673-80.
21. Zhang X, Li J. Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2013; 5:12-9.
22. Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:450-7.
23. Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93:395-406.
24. Raptis S, Bapat B. Genetic instability in human tumors. *EXS* 2006:303-20.
25. van Lier MG, Wagner A, van Leerdam ME, Biermann K, Kuipers EJ, Steyerberg EW, et al. A review on the molecular diagnostics of Lynch syndrome: a central role for the pathology laboratory. *J Cell Mol Med* 2010; 14:181-97.
26. Bartley AN, Luthra R, Saraiya DS, Urbauer DL, Broaddus RR. Identification of cancer patients with Lynch syndrome: clinically significant discordances and problems in tissue-based mismatch repair testing. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5:320-7.
27. Tao MH, Freudenheim JL. DNA methylation in endometrial cancer. *Epigenetics* 2010; 5:491-8.
28. Rubocki RJ, Duffy KJ, Shepard KL, McCue BJ, Shepherd SJ, Wisecarver JL. Loss of heterozygosity detected in a short tandem repeat (STR) locus commonly used for human DNA identification. *J Forensic Sci* 2000; 45:1087-9.
29. Janavicius R, Matiukaite D, Jakubauskas A, Griskevicius L. Microsatellite instability detection by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 2010; 56:1750-7.
30. Manual T. MSI analysis system, version 1.2. Madison, USA 2009:2-29.
31. Kaur G, Masoud A, Raihan N, Radzi M, Khamizar W, Kam LS. Mismatch repair genes expression defects & association with

- clinicopathological characteristics in colorectal carcinoma. *Indian J Med Res* 2011; 134:186-92.
32. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:96-104.
 33. De Schutter H, Spaepen M, Mc Bride WH, Nuyts S. The clinical relevance of microsatellite alterations in head and neck squamous cell carcinoma: a critical review. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:734-41.
 34. Koy S, Plaschke J, Luksch H, Friedrich K, Kuhlisch E, Eckelt U, et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2008; 30:1105-13.
 35. Numasawa H, Yamamoto N, Katakura A, Shibahara T. Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome 2q in human oral squamous cell carcinoma. *Bull Tokyo Dent Coll* 2005; 46:17-25.
 36. Lefeuvre M, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Beder L, et al. Fine deletion analysis of 1p36 chromosomal region in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2009; 38:94-8.
 37. Wild PJ, Reichle A, Andreesen R, Rockelein G, Dietmaier W, Ruschhoff J, et al. Microsatellite instability predicts poor short-term survival in patients with advanced breast cancer after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *Clin Cancer Res* 2004; 10:556-64.
 38. Kuligina E, Grigoriev MY, Suspitsin EN, Buslov KG, Zaitseva OA, Yatsuk OS, et al. Microsatellite instability analysis of bilateral breast tumors suggests treatment-related origin of some contralateral malignancies. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133:57-64.
 39. De Abreu FB, Pirolo LJ, Canevari Rde A, Rosa FE, Moraes Neto FA, Caldeira JR, et al. Shorter CAG repeat in the AR gene is associated with atypical hyperplasia and breast carcinoma. *Anticancer Res* 2007; 27:1199-205.

40. Woenckhaus M, Stoehr R, Dietmaier W, Wild PJ, Zieglmeier U, Foerster J, et al. Microsatellite instability at chromosome 8p in non-small cell lung cancer is associated with lymph node metastasis and squamous differentiation. *Int J Oncol* 2003; 23:1357-63.
41. Castagnaro A, Marangio E, Verduri A, Chetta A, D'Ippolito R, Del Donno M, et al. Microsatellite analysis of induced sputum DNA in patients with lung cancer in heavy smokers and in healthy subjects. *Exp Lung Res* 2007; 33:289-301.
42. Carpagnano GE, Spanevello A, Carpagnano F, Palladino GP, Prato R, Martinelli D, et al. Prognostic value of exhaled microsatellite alterations at 3p in NSCLC patients. *Lung Cancer* 2009; 64:334-40.
43. Warth A, Herpel E, Krysa S, Hoffmann H, Schnabel PA, Schirmacher P, et al. Chromosomal instability is more frequent in metastasized than in non-metastasized pulmonary carcinoids but is not a reliable predictor of metastatic potential. *Exp Mol Med* 2009; 41:349-53.
44. Hudler P. Genetic aspects of gastric cancer instability. *Scientific World Journal* 2012; 2012:761909.
45. Shokal U, Sharma PC. Implication of microsatellite instability in human gastric cancers. *Indian J Med Res* 2012; 135:599-613.
46. Pedrazzani C, Corso G, Velho S, Leite M, Pascale V, Bettarini F, et al. Evidence of tumor microsatellite instability in gastric cancer with familial aggregation. *Fam Cancer* 2009; 8:215-20.
47. Omori Y, Nakayama F, Li D, Kanemitsu K, Semba S, Ito A, et al. Alternative lengthening of telomeres frequently occurs in mismatch repair system-deficient gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100:413-8.
48. Kim SH, Ahn BK, Nam YS, Pyo JY, Oh YH, Lee KH. Microsatellite instability is associated with the clinicopathologic features of gastric cancer in sporadic gastric cancer patients. *J Gastric Cancer* 2010; 10:149-54.
49. Rubio-Del-Campo A, Salinas-Sanchez AS, Sanchez-Sanchez F, Gimenez-Bachs JM, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H, et al.

- Implications of mismatch repair genes *hMLH1* and *hMSH2* in patients with sporadic renal cell carcinoma. *BJU Int* 2008; 102:504-9.
50. Molina Burgos R, Millan Salvador JM, Oltra Soler JS, Jimenez Cruz JF. Microsatellite analysis in exfoliated cells from urinary sediment. Its utility for the detection of bladder cancer. Comparison with urinary cytology. *Actas Urol Esp* 2003; 27:618-28.
 51. Vaish M, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: a clinical significance. *BMC Urol* 2005; 5:2.
 52. Stančiūtė D. BA, Chvatovič G., Baranauskaitė I., Smailytė G., Ulys A., Didžiapetrienė J. Mikrosatelitinių sekų pokyčiai sergant šlapimo pūslės vėžiu. *Laboratorinė medicina* 2010; 1:3-7.
 53. Burger M, Denzinger S, Hammerschmied CG, Tannapfel A, Obermann EC, Wieland WF, et al. Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides (EMAST) and mismatch repair gene expression in prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* 2006; 84:833-41.
 54. Norris AM, Woodruff RD, D'Agostino RB, Jr., Clodfelter JE, Scarpinato KD. Elevated levels of the mismatch repair protein PMS2 are associated with prostate cancer. *Prostate* 2007; 67:214-25.
 55. Pal T, Permuth-Wey J, Kumar A, Sellers TA. Systematic review and meta-analysis of ovarian cancers: estimation of microsatellite-high frequency and characterization of mismatch repair deficient tumor histology. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6847-54.
 56. Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Katagiri A, et al. Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. *Oncol Rep* 2008; 19:775-81.
 57. Geyer JT, Lopez-Garcia MA, Sanchez-Estevez C, Sarrio D, Moreno-Bueno G, Franceschetti I, et al. Pathogenetic pathways in ovarian endometrioid adenocarcinoma: a molecular study of 29 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; 33:1157-63.

58. Garg K, Soslow RA, Rivera M, Tuttle MR, Ghossein RA. Histologically bland "extremely well differentiated" thyroid carcinomas arising in struma ovarii can recur and metastasize. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28:222-30.
59. Yoon BS, Kim YT, Kim JH, Kim SW, Nam EJ, Cho NH, et al. Clinical significance of microsatellite instability in sporadic epithelial ovarian tumors. *Yonsei Med J* 2008; 49:272-8.
60. Aysal A, Karnezis A, Medhi I, Grenert JP, Zaloudek CJ, Rabban JT. Ovarian endometrioid adenocarcinoma: incidence and clinical significance of the morphologic and immunohistochemical markers of mismatch repair protein defects and tumor microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:163-72.
61. Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 80:2008-18.
62. Wang Y, Liu VW, Tsang PC, Chiu PM, Cheung AN, Khoo US, et al. Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16 Suppl 1:259-66.
63. Clarke B, Gordon M, Moodley M, Naidoo R, Chetty R. Microsatellite analysis of early stage (Ia-IIb) uterine cervical squamous carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2003; 11:253-60.
64. Ou CY, Chang JG, Tseng HH, Wei HJ, Su TH, Hsu TY, et al. Analysis of microsatellite instability in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9:67-71.
65. Ercoli A, Ferrandina G, Genuardi M, Zannoni GF, Cicchillitti L, Raspaglio G, et al. Microsatellite instability is not related to response to cisplatin-based chemotherapy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15:308-11.
66. Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, Jorissen RN, Li S, Soo PY, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol* 2013; 108:1785-93.

67. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7:153-62.
68. Raulinaitytė D, Ugenskienė R, Jančiauskienė R, Juozaitytė E, Kairevičė L. Genai svarbūs storosios žarnos vėžio patogenezėje. *Sveikatos mokslai* 2012; 22:77-84.
69. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1506-12.
70. Heinimann K. Toward a molecular classification of colorectal cancer: The role of microsatellite instability status. *Front Oncol* 2013; 3:272.
71. Kim SH, Shin SJ, Lee KY, Kim H, Kim TI, Kang DR, et al. Prognostic value of mucinous histology depends on microsatellite instability status in patients with stage III colon cancer treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy: a retrospective cohort study. *Ann Surg Oncol* 2013; 20:3407-13.
72. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2073-87 e3.
73. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609-18.
74. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:3219-26.
75. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 2010; 46:2788-98.
76. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of

- benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:247-57.
77. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol* 2009; 27:1814-21.
 78. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Schischmanoff O, Perret GY, Morere JF. Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res* 2009; 29:1615-20.
 79. Schneider R, Schneider C, Kloor M, Furst A, Moslein G. Lynch syndrome: clinical, pathological, and genetic insights. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397:513-25.
 80. Wang Y, Wang Y, Li J, Cragun J, Hatch K, Chambers SK, et al. Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium. *J Hematol Oncol* 2013; 6:22.
 81. Stewart A. Genetic testing strategies in newly diagnosed endometrial cancer patients aimed at reducing morbidity or mortality from Lynch syndrome in the index case or her relatives. *PLOS Currents evidence on Genomic tests* 2013; Edition 1. doi: 10.1371/currents.eogt.b59a6e84f27c536e50db4e46aa26309c
 82. Cantor D. The frustrations of families: Henry Lynch, heredity, and cancer control, 1962-1975. *Med Hist* 2006; 50:279-302.
 83. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS, Biscione KA, Lynch JF, Danes BS. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15:209-13.
 84. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 2009; 76:1-18.

85. Moslein G. Hereditary colorectal cancer. *Chirurg* 2008; 79:1038-46.
86. Karamurzin Y, Rutgers JK. DNA mismatch repair deficiency in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28:239-55.
87. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:919-32.
88. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10:293-300.
89. Vasen HF, Boland CR. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *JAMA* 2005; 293:2028-30.
90. Ramssoekh D, Wagner A, van Leerdam ME, Dinjens WN, Steyerberg EW, Halley DJ, et al. A high incidence of MSH6 mutations in Amsterdam criteria II-negative families tested in a diagnostic setting. *Gut* 2008; 57:1539-44.
91. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, Morreau H, van Puijenbroek M, Tops C, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130:312-22.
92. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34:424-5.
93. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116:1453-6.
94. Church J, McGannon E. Family history of colorectal cancer: how often and how accurately is it recorded? *Dis Colon Rectum* 2000; 43:1540-4.
95. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary

- Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1758-62.
96. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:261-8.
 97. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:5783-8.
 98. Lancaster JM, Powell CB, Kauff ND, Cass I, Chen LM, Lu KH, et al. Society of Gynecologic Oncologists Education Committee statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecol Oncol* 2007; 107:159-62.
 99. Hereditary colorectal cancer. Association of Comprehensive Cancer Centers. Žiūrēta: 2014-07-10. Prieiga per internetu: [<http://www.oncoline.nl/hereditary-colorectal-cancer>].
 100. Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013; 62:812-23.
 101. Weiderpass E, Labreche F. Malignant tumors of the female reproductive system. *Saf Health Work* 2012; 3:166-80.
 102. Bray F, Loos AH, Oostindier M, Weiderpass E. Geographic and temporal variations in cancer of the corpus uteri: incidence and mortality in pre- and postmenopausal women in Europe. *Int J Cancer* 2005; 117:123-31.
 103. Beral V, Bull D, Reeves G, Million Women Study C. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2005; 365:1543-51.

104. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1995; 85:304-13.
105. Anderson GL, Judd HL, Kaunitz AM, Barad DH, Beresford SA, Pettinger M, et al. Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA* 2003; 290:1739-48.
106. Bland AE, Calingaert B, Secord AA, Lee PS, Valea FA, Berchuck A, et al. Relationship between tamoxifen use and high risk endometrial cancer histologic types. *Gynecol Oncol* 2009; 112:150-4.
107. Iqbal J, Ginsburg OM, Wijeratne TD, Howell A, Evans G, Sestak I, et al. Endometrial cancer and venous thromboembolism in women under age 50 who take tamoxifen for prevention of breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2012; 38:318-28.
108. Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, von Gruenigen VE. Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecol Oncol* 2009; 114:121-7.
109. Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114:71-83.
110. Lu L, Risch H, Irwin ML, Mayne ST, Cartmel B, Schwartz P, et al. Long-term overweight and weight gain in early adulthood in association with risk of endometrial cancer. *Int J Cancer* 2011; 129:1237-43.
111. Friberg E, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes and risk of endometrial cancer: a population-based prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:276-80.
112. Noto H, Osame K, Sasazuki T, Noda M. Substantially increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic evidence in Japan. *J Diabetes Complications* 2010; 24:345-53.

113. Karageorgi S, Hankinson SE, Kraft P, De Vivo I. Reproductive factors and postmenopausal hormone use in relation to endometrial cancer risk in the Nurses' Health Study cohort 1976-2004. *Int J Cancer* 2010; 126:208-16.
114. Kwon JS, Scott JL, Gilks CB, Daniels MS, Sun CC, Lu KH. Testing women with endometrial cancer to detect Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 2011; 29:2247-52.
115. Goshen R, Chu W, Elit L, Pal T, Hakimi J, Ackerman I, et al. Is uterine papillary serous adenocarcinoma a manifestation of the hereditary breast-ovarian cancer syndrome? *Gynecol Oncol* 2000; 79:477-81.
116. Lucenteforte E, Talamini R, Montella M, Dal Maso L, Pelucchi C, Franceschi S, et al. Family history of cancer and the risk of endometrial cancer. *Eur J Cancer Prev* 2009; 18:95-9.
117. Hinkula M, Pukkala E, Kyyronen P, Kauppila A. Grand multiparity and incidence of endometrial cancer: a population-based study in Finland. *Int J Cancer* 2002; 98:912-5.
118. Setiawan VW, Pike MC, Karageorgi S, Deming SL, Anderson K, Bernstein L, et al. Age at last birth in relation to risk of endometrial cancer: pooled analysis in the epidemiology of endometrial cancer consortium. *Am J Epidemiol* 2012; 176:269-78.
119. Vessey M, Painter R. Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968-2004. *Br J Cancer* 2006; 95:385-9.
120. Mueck AO, Seeger H, Rabe T. Hormonal contraception and risk of endometrial cancer: a systematic review. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17:R263-71.
121. Bandera EV, Kushi LH, Moore DF, Gifkins DM, McCullough ML. Fruits and vegetables and endometrial cancer risk: a systematic literature review and meta-analysis. *Nutr Cancer* 2007; 58:6-21.
122. McCullough ML, Bandera EV, Patel R, Patel AV, Gansler T, Kushi LH, et al. A prospective study of fruits, vegetables, and risk of endometrial cancer. *Am J Epidemiol* 2007; 166:902-11.

123. Kabat GC, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Rohan TE. Intake of fruits and vegetables, and risk of endometrial cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Epidemiol* 2010; 34:568-73.
124. Arem H, Park Y, Pelsler C, Ballard-Barbash R, Irwin ML, Hollenbeck A, et al. Prediagnosis body mass index, physical activity, and mortality in endometrial cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105:342-9.
125. Dieli-Conwright CM, Ma H, Lacey JV, Jr., Henderson KD, Neuhausen S, Horn-Ross PL, et al. Long-term and baseline recreational physical activity and risk of endometrial cancer: the California Teachers Study. *Br J Cancer* 2013; 109:761-8.
126. Al-Zoughool M, Dossus L, Kaaks R, Clavel-Chapelon F, Tjønneland A, Olsen A, et al. Risk of endometrial cancer in relationship to cigarette smoking: results from the EPIC study. *Int J Cancer* 2007; 121:2741-7.
127. Zhou B, Yang L, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, et al. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Am J Med* 2008; 121:501-8 e3.
128. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; 15:10-7.
129. Plataniotis G, Castiglione M and On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5:v41-5.
130. Marchetti M, Vasile C, Chiarelli S. Endometrial cancer: asymptomatic endometrial findings. Characteristics of postmenopausal endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26:479-84.
131. Samarathai N, Hall K, Yeh IT. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstet Gynecol Int* 2010; 2010:162363.
132. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* 2009; 16:8-13.

133. Engelsen IB, Akslen LA, Salvesen HB. Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS* 2009; 117:693-707.
134. McConechy MK, Ding J, Cheang MC, Wiegand KC, Senz J, Tone AA, et al. Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol* 2012; 228:20-30.
135. Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Catusus L, Abal M, Colas E, et al. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene* 2013; 32:403-13.
136. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catusus L. Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology* 2007; 39:72-87.
137. Tibiletti MG, Furlan D, Taborelli M, Facco C, Riva C, Franchi M, et al. Microsatellite instability in endometrial cancer: relation to histological subtypes. *Gynecol Oncol* 1999; 73:247-52.
138. Honore LH, Hanson J, Andrew SE. Microsatellite instability in endometrioid endometrial carcinoma: correlation with clinically relevant pathologic variables. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1386-92.
139. Black D, Soslow RA, Levine DA, Tornos C, Chen SC, Hummer AJ, et al. Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:1745-53.
140. Fiumicino S, Ercoli A, Ferrandina G, Hess P, Raspaglio G, Genuardi M, et al. Microsatellite instability is an independent indicator of recurrence in sporadic stage I-II endometrial adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:1008-14.
141. Mackay HJ, Gallinger S, Tsao MS, McLachlin CM, Tu D, Keiser K, et al. Prognostic value of microsatellite instability (MSI) and PTEN expression in women with endometrial cancer: results from studies of the NCIC Clinical Trials Group (NCIC CTG). *Eur J Cancer* 2010; 46:1365-73.
142. Zigelboim I, Goodfellow PJ, Gao F, Gibb RK, Powell MA, Rader JS, et al. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and

- outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. *J Clin Oncol* 2007; 25:2042-8.
143. Schneeberger K, Hagmann J, Ossowski S, Warthmann N, Gesing S, Kohlbacher O, et al. Simultaneous alignment of short reads against multiple genomes. *Genome Biol* 2009; 10:R98.
 144. Shannon C, Kirk J, Barnetson R, Evans J, Schnitzler M, Quinn M, et al. Incidence of microsatellite instability in synchronous tumors of the ovary and endometrium. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1387-92.
 145. Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, et al. Survivin expression in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with correlation with PTEN and STAT-3. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24:247-53.
 146. Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol* 2009; 62:777-85.
 147. Cancer Genetics Study Section [CG] Žiūrēta: 2014-10-07. Prieiga per internetą:
[\[http://public.csr.nih.gov/StudySections/IntegratedReviewGroups/OBTIRG/CG/Pages/default.aspx\]](http://public.csr.nih.gov/StudySections/IntegratedReviewGroups/OBTIRG/CG/Pages/default.aspx).
 148. Leenen CH, van Lier MG, van Doorn HC, van Leerdam ME, Kooi SG, de Waard J, et al. Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer \leq 70 years. *Gynecol Oncol* 2012; 125:414-20.
 149. Backes FJ, Leon ME, Ivanov I, Suarez A, Frankel WL, Hampel H, et al. Prospective evaluation of DNA mismatch repair protein expression in primary endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 114:486-90.
 150. Clarke BA, Cooper K. Identifying Lynch syndrome in patients with endometrial carcinoma: shortcomings of morphologic and clinical schemas. *Adv Anat Pathol* 2012; 19:231-8.

151. Lamberti C, Lundin S, Bogdanow M, Pagenstecher C, Friedrichs N, Buttner R, et al. Microsatellite instability did not predict individual survival of unselected patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22:145-52.
152. Bilbao C, Lara PC, Ramirez R, Henriquez-Hernandez LA, Rodriguez G, Falcon O, et al. Microsatellite instability predicts clinical outcome in radiation-treated endometrioid endometrial cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76:9-13.
153. Maxwell GL, Risinger JI, Alvarez AA, Barrett JC, Berchuck A. Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. *Obstet Gynecol* 2001; 97:417-22.
154. Peterson LM, Kipp BR, Halling KC, Kerr SE, Smith DI, Distad TJ, et al. Molecular characterization of endometrial cancer: a correlative study assessing microsatellite instability, MLH1 hypermethylation, DNA mismatch repair protein expression, and PTEN, PIK3CA, KRAS, and BRAF mutation analysis. *Int J Gynecol Pathol* 2012; 31:195-205.
155. Modica I, Soslow RA, Black D, Tornos C, Kauff N, Shia J. Utility of immunohistochemistry in predicting microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:744-51.
156. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444:135-41.
157. Weissman SM, Burt R, Church J, Erdman S, Hampel H, Holter S, et al. Identification of individuals at risk for Lynch syndrome using targeted evaluations and genetic testing: National Society of Genetic Counselors and the Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer joint practice guideline. *J Genet Couns* 2012; 21:484-93.

9. PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI

Straipsniai disertacijos tema

1. Didžiapetrienė J., **Kanopienė D.**, Gudlevičienė Ž., Sužiedėlis K., Uleckienė S., Vidugirienė J. Mikrosatelitinis nestabilumas sergant onkologinėmis ligomis. Lietuvos akušerija ir ginekologija. 2010; 13(2):170-7.
2. Didžiapetrienė J., **Kanopienė D.**, Valuckas K. P., Uleckienė S., Atkočius V., Mickė I., Sužiedėlis K. Mikrosatelitų nestabilumas ir heterozigotiškumo praradimas sergant vėžiu. Medicina (Kaunas). 2011; 47(2): 125-35.
3. **Kanopiene D.**, Vidugiriene J., Valuckas K. P., Smailyte G., Uleckiene S., Bacher J. Endometrial cancer and microsatellite instability status. Centr. Eur. J. Med. 2014 (priimtas spaudai).
4. **Kanopienė D.**, Meškauskas R., Laurinavičienė A., Schweigert D., Chvatovič G., Sužiedėlis K. DNR klaidingai suporuotų nukleotidų taisymo sistemos baltymų (MLH1, MSH2, MSH6 IR PMS2) raiška endometriumo navikuose. Lietuvos akušerija ir ginekologija. 2014; 7(2): 113-21.
5. **Kanopiene D.**, Smailyte G., Vidugiriene J., Bacher J. Impact of microsatellite instability on survival of endometrial cancer patients. Medicina (Kaunas). 2014; DOI: 10.1016/j.medici.2014.09.002 (priimtas spaudai).

Pranešimai mokslinėse konferencijose

1. **Kanopiene D.** Microsatellite instability in cervical and corporis uteri cancer. International conference “Modern radiation oncology: economical aspects and innovations in the treatment”. Palanga (Lithuania), Sept. 14-15, 2012.
2. Bacher J., Vidugiriene J., **Kanopiene D.** New markers for improved detection of MSI in endometrial cancers. Annual Meeting of the Association-for-Molecular-Pathology. Long Beach, CA, Oct. 25-27, 2012.

3. Bacher J., Grimes I., Albrecht D., Weiss J., Sievers C., Richie K., Agni R., Reichelderfer M., Vidugiriene J., **Kanopiene D.** New markers for improved detection of MSI in early and extra-colonic tumors. Annual Meeting of the Association-for-Molecular-Pathology. Phoenix, AZ, Nov. 14-16, 2013.
4. **Kanopiene D.**, Laurinaviciene A., Meskauskas R., Uleckiene S., Valuckas K. P. Evaluation of DNA mismatch repair system protein expression in endometrial carcinomas. 6th Baltic Congress of Oncology "Multidisciplinary approach in cancer care". Vilnius (Lithuania), Oct. 3-4, 2014.

Tezès

1. Bacher J., Vidugiriene J., **Kanopiene D.** New markers for improved detection of MSI in endometrial cancers. *J. Mol. Diagn.* 2012; 14(6): 708.
2. Bacher J., Grimes I., Albrecht D., Weiss J., Sievers C., Richie K., Agni R., Reichelderfer M., Vidugiriene J., **Kanopiene D.** New markers for improved detection of MSI in early and extra-colonic tumors. *J. Mol. Diagn.* 2013; 15(6): 916.
3. **Kanopiene D.**, Laurinaviciene A., Meskauskas R., Uleckiene S., Valuckas K. P. Evaluation of DNA mismatch repair system protein expression in endometrial carcinomas. Book of Abstracts of 6th Baltic Congress of Oncology "Multidisciplinary approach in cancer care". Vilnius (Lithuania), Oct. 3-4, 2014, 68.



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Kodas 211950810, M.K. Čiurlionio 21/27, 03101, Vilnius Tel.(85)2398701, 2398700, faks.2398705, El.p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
M.K.Čiurlionio 21/27, LT-03101,Vilnius Tel.(85) 2686998, el.p.: rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ

2010-05-05 Nr.158200-05-180-43

Biomedicininio tyrimo pavadinimas:

Sergančiųjų gimdos kaklelio ikivėžinėmis ligomis ir vėžiu bei gimdos kūno vėžiu mokrosatelitinio nestabilumo tyrimas

Protokolo Nr.: I-2010-1

Versija: 1

Data: 2010.03.18

Asmens informavimo forma ir Informuoto asmens sutikimo forma lietuvių kalba:

Versija: 3

Data: 2010.04.28.

Pagrindinis tyrėjas: **D.Kanopienė, K.Sužiedelis, J.Didžiapetrienė**

Biomedicininio tyrimo vieta:

[staigos pavadinimas: VU Onkologijos Institutas

[staigos adresas: Santariškių g.1, Vilnius LT-08660

[staigos pavadinimas: VUOI Mokslinių tyrimų centras

[staigos adresas: P.Baublio g.3B, LT-08406 Vilnius

[staigos pavadinimas: VUOI Poliklinika

[staigos adresas: Santariškių g.1, LT-08660 Vilnius

Leidimas išduotas Vilniaus Regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio, vykusio 2010 m. gegužės mėn. 04 d., sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. Dr.Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	doc. Dr. Kęstutis Žagminas	epidemiologija	taip
3	dr. Gytis Andrulionis	teisė	taip
4	dr. Marija Veniūtė	visuomenės sveikata	ne
5	doc.dr. Jolanta Gulbinovič	medicina	taip
6	doc.dr. Vytautė Pečiulienė	medicina, odontologija	taip
7	Laura Malinauskienė	medicina	taip
8	dr. Gražina Pastavkaitė	klinikinė psichologija	taip
9	Ugnė Sakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkas



Gytis Andrulionis

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Tyrimo pavadinimas:

Sergančiųjų gimdos kaklelio ikivėžinėmis ligomis ir vėžiu bei gimdos kūno vėžiu mikrosatelitinio nestabilumo tyrimas

Pagrindinis tyrėjas: gyd. Daiva Kanopienė

Pacientės vardas, pavardė

Gimimo data

Aš perskaičiau pateiktą informaciją apie tyrimą, kuriame esu pakviesta dalyvauti. Turėjau galimybę aptarti smulkmenas ir užduoti iškilusius klausimus. Gydantis gydytojas paaiškino tyrimo esmę bei tikslą ir aš suprantu, kas man yra siūloma.

Aš buvau informuota apie tyrimą ir suprantu, kad šis tyrimas yra svarbus, gerinant diagnostiką ir yra patvirtintas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto.

Aš supratau, kad mano dalyvavimas tyrime yra laisvanoriškas ir aš galiu nevaržoma iš jo pasitraukti bet kuriuo metu, nenurodydama priežasties, ir šis sprendimas neturės neigiamo poveikio mano sveikatos priežiūrai.

Jeigu atliekant tyrimą prireiks medicininių paciento dokumentų, tyrėjams bus suteikta teisė susipažinti su mano asmens sveikatos istorija.

Suprantu, kad mano dalyvavimas tyrime ir mano individualūs tyrimo duomenys liks paslapyje. Pasinaudoti šiais duomenimis galės tik tyrėjai.

Esu informuota, kad atliekamas tyrimas neturi žalingo poveikio. Man paaiškinta, kad tyrimo metu bus paimtas ląstelių mėginys iš gimdos kūno kaklelio švelniu šepetėliu ir veninis kraujas. Suprantu, kad imant mėginius gali būti nemalonūs pojūčiai, tačiau suprantu, kad šio tyrimo metu bus nustatytas ne tik infektuotumas žmogaus papildomos virusu, bet papildomai atlikti genetiniai ir imunofermentiniai tyrimai, kurie svarbūs ligos prognozei. Man pažadėtas konfidencialumas bei gautų duomenų saugumas. Aš taip pat sutinku, kad šio tyrimo rezultatai gali būti publikuojami, bet mano tapatybė nebus atskleista. Aš sutinku, kad tyrėjai pasinaudos mano duomenimis, esančiais ligos istorijoje, kuri gali būti naudojama šio ir kito tyrimo tikslams.

Sąmoningai ir laisva valia sutinku dalyvauti tyrime, kuris man buvo išaiškintas.

Sutinku dalyvauti tyrime: pacientės parašas

Sutinku, kad tyrėjai pasinaudos mano duomenimis: pacientės parašas

Aš, gydantis gydytojas, patvirtinu, kad paaiškinau anksčiau paminėtai pacientei (savanorei) būsimojo tyrimo esmę ir tikslą.

Data:

Jeigu Jums iškilo problemų dėl šio tyrimo, prašome pranešti:

Pagrindinis tyrėjas (vardas, pavardė, parašas): gyd. Daiva Kanopienė

ASMENS INFORMAVIMO FORMA

Kviečiame Jus dalyvauti moksliniame klinikiame tyrime „Sergančiųjų gimdos kaklelio ikivėžinėmis ligomis ir vėžiu bei gimdos kūno vėžiu mikrosatelitinio nestabilumo tyrimas“.

Šio tyrimo pagrindinis tikslas – įvertinti chromosomų dalių, kurios vadinasi mikrosatelitais, pokyčių svarbą gimdos kaklelio ir gimdos kūno vėžiui formuotis ir numatyti, kaip liga vystysis; antrinės svarbos tikslas – nustatyti ląstelės baltymo (*Notch*), atsakingo už ląstelių tarpusavio sąveiką, koncentraciją.

Dalyvauti šiame tyrime kviečiamos moterys, kurios atvyksta pasitikrinti į Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Konsultacinę polikliniką dėl gimdos kaklelio ikivėžinių ligų bei gimdos kaklelio ar gimdos kūno vėžio.

Įprastinės apžiūros metu Jums bus siūloma:

- panaudojus šepetėlį paimti nuograndas nuo gimdos kaklelio žmogaus papilomos virusui nustatyti;
- paimti 3 ml kraujo iš venos, taip pat naviko audinio (jo bus paimama atliekant įprastines Jūsų diagnostikai ir gydymui būtinas procedūras, pvz., biopsija, operacija ir kt.) biologiniams žymenims nustatyti.

Infekuotumas žmogaus papilomos virusu didelei daliai moterų rodo padidėjusią riziką susirgti gimdos kaklelio vėžiu. Taigi šis tyrimas Jums yra naudingas, nes Jūs sužinosite, ar esate apsikrėtusi šiuo virusu.

Biologiniai žymenys yra ląstelės komponentai, kuriuos galima nustatyti kraujyje bei navike ir gauti papildomų detalesnių duomenų apie Jūsų ligą. Jūsų audinių analizei bus panaudoti nauji metodai siekiant iširti skirtumus, nustatomus nukleorūgštyse, kurios kartu su baltymais sudaro chromosomas bei lemia genų funkcijas. Nustatyti skirtumai padės įvertinti chromosomų sudėtinų dalių – mikrosatelitų pokyčius ląstelėse ir genominių sričių, nuo kurių priklauso ląstelės baltymų funkcijos, persitvarkymus. Tokie tyrimai kol kas dar nėra naudojami kasdienėje onkologijos praktikoje, tačiau jau atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad tai svarbu vertinant ligos prognozę, kas gali padėti gydytojui teisingiau parinkti gydymo taktiką. *Notch* baltymo nustatymas gali būti svarbus tuo atveju, jeigu Jums būtų skiriamas gydymas vaistais. Yra duomenų, kad, esant šio baltymo sumažėjusiai koncentracijai, jautrumas kai kuriems vaistams (pvz., cisplatinai) yra didesnis, todėl ateityje gauti rezultatai galės pasitarnauti parenkant vaistą.

Išgyvenanumas bus vertinamas Jūsų ilgalaikės stebėsenos metu ir Jūs būsite kviečiama apsilankyti pas onkologą įprasta tvarka (pirmaisiais metais po diagnozės nustatymo – kas 3 mėn., nuo antrųjų metų – kas 6 mėn. ir praėjus penkiems metams – 1 kartą į metus). Jūs nebūsite kviečiama papildomai atvykti dėl vykdomo tyrimo.

Pažymime, kad Jūsų dalyvavimas tyrime yra visiškai savanoriškas, nereikalauja papildomo atvykimo pas gydytoją bei papildomų išlaidų.

Jūs bet kada galėsite atsisakyti dalyvauti tyrime ir tai visiškai neturės įtakos tolesnei Jūsų gydymo priežiūrai. Iškilus neaiškumų ar norėdami gauti papildomos informacijos galite kreiptis į pagrindinę tyrėją gyd. Daivą Kanopienę (tel. 2786-710).

Medicininė dokumentacija bus užrašoma ir saugoma. Jūsų asmeniniai duomenys ir duomenys apie ligą nebus viešinami. Jei Jums kyla klausimų dėl Jūsų, kaip šio tyrimo dalyvio teisių, prašome kreiptis į Vilniaus regioninį biomedicininį tyrimų etikos komitetą (tel. 2686-998).

Šio projekto Nr. I-2010-1, Versija 3, 2010-04-28.

Data: _____ Paciento parašas _____

Pagrindinis tyrėjas gydytojas _____

AMSTERDAMO II KRITERIJŲ KLAUSIMYNAS Nr. _____

- Mažiausiai 3 giminaičiai sirgo Lynčo sindromo spektro navikais: storosios žarnos, gimdos kūno, plonosios žarnos, šlapimtakių ar inkstų geldelių; vienas iš sergančiųjų turėjo būti kitų dviejų pirmos eilės giminaitis.

Taip Ne Nežinau

- Minėti navikai diagnozuoti mažiausiai dvejose iš eilės einančiose kartose.

Taip Ne Nežinau

- Bent vienas navikas diagnozuotas iki 50 metų amžiaus.

Taip Ne Nežinau

- Navikai patvirtinti histologiškai ir atmesta šeiminė adenomatozinė polipozė esant storosios žarnos vėžiui.

Taip Ne Nežinau